

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Juli 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/056900 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 38/00** **(74) Anwälte:** **SCHRELL, Andreas usw.**; Maybachstrasse 6A, 70469 Stuttgart (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/14518 **(81) Bestimmungsstaaten (national):** JP, US.

(22) Internationales Anmeldedatum: 11. Dezember 2001 (11.12.2001) **(84) Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(25) Einreichungssprache: Deutsch **Veröffentlicht:**
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 01 793.6 17. Januar 2001 (17.01.2001) DE

(71) Anmelder und
(72) Erfinder: **NILIUS, Manfred** [DE/DE]; Breitscheidstrasse 51, 39114 Magdeburg (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



(54) Title: USE OF SLPI FOR TREATING CHRONIC INFLAMMATORY INTESTINAL DISEASES

A2 **(54) Bezeichnung:** VERWENDUNG VON SLPI ZUR BEHANDLUNG CHRONISCH-ENTZÜNDLICHER DARMERKRANKUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to the use of secretory leucocyte protease inhibitor (SLPI) or a non-pathogenic micro-organism which is capable of forming the same, and which contains a nucleic acid coding for SLPI, for treating human and animal chronic inflammatory intestinal diseases. The invention also relates to pharmaceutical compositions for oral or rectal administration, containing the active ingredient SLPI or micro-organisms expressing SLPI, and a method for producing said pharmaceutical compositions.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von sekretorischem Leukocyten-Protease-Inhibitor (SLPI) oder eines zur SLPI-Bildung befähigten nicht-pathogenen Mikroorganismus, der eine SLPI codierende Nucleinsäure enthält, zur Behandlung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen von Mensch und Tier, pharmazeutische Zusammensetzungen zur oralen oder rektalen Verabreichung, die den Wirkstoff SLPI oder SLPI-exprimierende Mikroorganismen enthalten, sowie Verfahren zur Herstellung dieser pharmazeutischen Zusammensetzungen.

WO 02/056900

Verwendung von SLPI zur Behandlung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von sekretorischem Leukocyten-Protease-Inhibitor (SLPI) oder eines zur SLPI-Bildung befähigten nicht-pathogenen Mikroorganismus, der eine SLPI codierende Nucleinsäure enthält, zur Behandlung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen von Mensch und Tier, pharmazeutische Zusammensetzungen zur oralen oder rektalen Verabreichung, die den Wirkstoff SLPI oder SLPI-exprimierende Mikroorganismen enthalten, sowie Verfahren zur Herstellung dieser pharmazeutischen Zusammensetzungen.

Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), zu denen im erweiterten Sinne Enteritis necroticans, Enteritis regionalis Crohn (Morbus Crohn), Colitis cystica, Colitis granulomatosa, Colitis gravis, Colitis haemorrhagia, Colitis ischaemica, Colitis mucosa und Colitis ulcerosa gehören, sind durch schubartig verlaufende destruierende Entzündungsreaktionen der Darmschleimhaut gekennzeichnet. Die schwersten Formen Enteritis regionalis Crohn (Morbus Crohn) und Colitis ulcerosa unterscheiden sich in ihrem Verteilungsmuster, ihrem makroskopischen und histologischen Bild.

Morbus Crohn ist eine unspezifische granulomatöse Entzündung, die alle Abschnitte des Verdauungstraktes vom Ösophagus bis zum After befallen kann, je-

doch vor allem im Bereich des unteren Ileums und des Kolons vorkommt. In etwa 40 % aller Fälle ist ausschließlich das terminale Ileum betroffen, seltener Ösophagus und Magen. Bei Colitis ulcerosa 5 handelt es sich um eine diffuse kontinuierliche Entzündung der Dickdarmschleimhaut, die durch Ulcerationen und zwischen diesen stehengebliebenen Schleimhautinseln gekennzeichnet ist, wobei die Erkrankung nur in seltenen Fällen auf den Dünndarm 10 übergreift. Die definitive Diagnose einer CED kann häufig nur durch den chronischen Verlauf erfolgen. Bei der Colitis ulcerosa ist lediglich die Schleimhaut betroffen, während der Morbus Crohn Granulome aufweist, wobei sämtliche Wandschichten betroffen 15 sind und sich oftmals Fisteln bilden. Häufig ist jedoch eine Trennung zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa nicht möglich.

Die Ursachen der Entstehung einer CED sind noch weitestgehend unklar. So wird Morbus Crohn auf 20 immunologische Faktoren, genetische Faktoren, wie polygene Vererbung, Ernährungsfaktoren, wie beispielsweise den häufigen Verzehr von Süßigkeiten, sowie infektiöse Faktoren, beispielsweise Rotaviren, kapsellose Mykobakterien und Pseudomonaden, 25 zurückgeführt. Ebenso wird dem psychosozialen Umfeld und der prämorbidien Persönlichkeitsstruktur Bedeutung beigemessen. Colitis ulcerosa wird mit einer familiären Disposition, Gynäkotropie, psychosomatischen Faktoren und Autoimmunmechanismen in 30 Verbindung gebracht. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass für die Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wahrscheinlich eine

pathologisch gesteigerte Aktivierung des mukosalen Immunsystems von entscheidender Bedeutung ist.

Da eine kausale Therapie noch nicht möglich ist, zielt die Behandlung von Morbus Crohn und Colitis 5 ulcerosa hauptsächlich auf die Linderung der Symptome ab. Die derzeit etablierten Therapien für chronisch entzündliche Darmerkrankungen basieren im Wesentlichen auf unspezifischen, entzündungshemmenden Substanzen wie Glukokortikoiden und Aminosalizylaten.
10

Glukokortikoide hemmen über eine Reduktion des nukleären Faktors Kappa B die Synthese fast sämtlicher proentzündlicher Cytokine, die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Produktion von Prostaglandinen und Leukotrienen. Eine Langzeitprophylaxe mit Glukokortikoiden ist jedoch nicht sinnvoll, da gezeigt wurde, dass mit der langfristigen Gabe gravierende unerwünschte Wirkungen einhergehen. Absolute Kontraindikationen der Glukokortikoidtherapie 15 sind Abszesse, relative Kontraindikationen sind Konglomerattumoren beziehungsweise intraabdominelle Resistenzen und enteroenterale Fisteln. Bei neu entwickelten Glukokortikoiden, beispielsweise Budesonid, zeigt sich, dass die Nebenwirkungen der Steroidtherapie zumindest kurzfristig verringert werden können. In der akuten Phase muss Budesonid allerdings so hoch dosiert werden, dass über die topische Wirkung hinaus eine, wenn auch vergleichsweise geringe, systemische Wirkung zu beobachten 20
25
30 ist.

Aminosalizylate reduzieren ebenfalls den nucleären Faktor Kappa B und damit die Bildung von proentzündlichen Cytokinen beziehungsweise ihrer Rezeptoren. Dieser Effekt ist jedoch weit schwächer ausgeprägt als bei der Steroidbehandlung. Aminosalizylate sind bei der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen insgesamt weniger wirksam als Glukokortikoide. Die derzeit verwendeten galenischen Formulierungen wurden mit dem Ziel einer unterschiedlichen Freisetzungsscharakteristik, das heißt einer Freisetzung vom proximalen Dünndarm bis zum proximalen Kolon, konzipiert. Bislang ist jedoch nicht gesichert, dass die unterschiedlichen anatomischen Freisetzungsorte im Sinne einer lokal gezielten Therapie tatsächlich einen therapeutischen Vorteil aufweisen.

In bestimmten klinischen Situationen wird die Verabreichung von Glukokortikoiden beziehungsweise Aminosalizylaten von einer Umstellung der Ernährung begleitet. Bei schweren Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Schüben ist eine komplette parenterale Ernährung unumgänglich. Vor allem bei Kindern mit Wachstumsstörungen oder bei schweren Steroidnebenwirkungen wird eine bilanzierte enterale Diät verschrieben. Es hat sich jedoch gezeigt, dass es keine in ihrer Wirksamkeit gesicherte Morbus Crohn- und Colitis-Diät gibt, da Untersuchungen zur Ausschlussdiät, kohlenhydratreduzierten Diät oder zu Fischölpräparaten zum Teil widersprüchliche Befunde ergaben (Stange und Schreiber, Deutsches Ärzteblatt, 22 (1997), 1493-1498).

Bei chronisch aktiven Patienten wird eine immun-suppressive Therapie im engeren Sinne, das heißt mit Medikamenten wie Azathioprin, seinem Metaboliten 6-Mercaptopurin, Methotrexat und Cyclosporin 5 angewandt.

Ein positiver Effekt von Azathioprin und seines Metaboliten 6-Mercaptopurin auf die Heilung und Absonderung von Fisteln wurde klinisch immer wieder beschrieben, wurde jedoch nie in großen Untersuchungen 10 prospektiv und kontrolliert abgesichert (Present et al., N. Engl. J. Med., 302 (1980), 981-987; Present et al., Annals Internal Medicine, 111 (1989), 641-649). Als nachteilig erweist sich auch, dass die mittlere Latenz bis zum Therapieeffekt etwa 15 drei Monate beträgt, wobei immerhin noch etwa 20 % der Patienten vier bis sieben Monate brauchen, um auf die Therapie anzusprechen. Bei Colitis ulcerosa sind nur wenige kontrollierte Studien zum Einsatz von Azathioprin durchgeführt worden. Sie zeigten jedoch, dass das Medikament bei akuter Colitis ulcerosa nicht indiziert ist. Azathioprin verursacht eine Reihe von Nebenwirkungen, zu denen dosisunabhängige allergische Reaktionen, wie Übelkeit, Durchfall, Gelenkschmerzen und Erhöhung von Leber-20 enzymen, und dosisabhängige Nebenwirkungen, wie Cytopenie, Infektionen und toxische Hepatitis, gehören. 25

Methotrexat ist eine immunsuppressive Substanz, die das Enzym Dihydrofolatreduktase inhibiert und auf diese Weise in den Purinstoffwechsel eingreift. Methotrexat hat zahlreiche Effekte auf das humane Immunsystem. Es supprimiert die Antikörperproduktion 30

von B-Zellen, die Monocytenaktivierung, die Neovascularisierung und die Aktivierung von Granulocyten. Der Einsatz von Methotrexat erfolgt zur Zeit nur bei Azathioprin-resistenten Verlaufsformen von Morbus Crohn, nicht jedoch bei Colitis ulcerosa.

Cyclosporin A wirkt bevorzugt auf Lymphocyten und hemmt deren clonale Expansion und Proliferation. In drei von vier Studien erwies sich der klinische Einsatz von Cyclosporin A bei der Behandlung von 10 chronisch aktivem Morbus Crohn als wirkungslos (Neurath und Stange, Deutsches Ärzteblatt, 28-29 (2000), 1672-1678). Darüber hinaus verursacht Cyclosporin A häufig Nebenwirkungen wie Hypertonie, diabetische Stoffwechsellage, Niereninsuffizienz 15 und gelegentlich opportunistische Infektionen.

Seit 1980 werden auch Ansätze zur selektiven Immunmodulation entwickelt, um chronisch-rezidivierende, unspezifische Darmentzündungen zu therapieren. Diese beruhen auf einer Beeinflussung des Gleichgewichtes zwischen entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Cytokinen im Darm. Dies soll erreicht werden, indem die Sekretion proinflammatorischer Cytokine unterdrückt wird oder indem kontrainflammatorische Cytokine, wie Interleukin 10 25 (IL-10) oder Interleukin 4, in ihrer Bildung stimuliert oder substituiert werden.

In tierexperimentellen Untersuchungen führte eine Inaktivierung des IL-10-Gens zum Auftreten einer chronischen Darmerkrankung. Ferner übte rekombinantes IL-10 einen präventiven Effekt auf die Entwicklung einer experimentellen Colitis aus, wobei die 30

zur Therapie erforderliche Steroidmenge reduziert wurde. In mehreren Studien wurde der potenzielle therapeutische Effekt von IL-10 bei Patienten mit Morbus Crohn evaluiert. Nach klinischen und endoskopischen Kriterien wurde bei etwa 30% der Patienten eine Remission beobachtet. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Verwendung von IL-11 erhalten (Neurath und Stange, Deutsches Ärzteblatt, 97 (2000), 1672-1678). Steidler et al. (Science, 289 (2000), 1352-1355) beschreiben die Verwendung eines IL-10 sezernierenden rekombinanten *Lactococcus lactis*-Stammes zur Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in einem Maus-Modell. Dabei wurden lebende rekombinante *L. lactis*-Keime über einen Zeitraum von 14 Tagen täglich an erkrankte Tiere verabreicht. Es zeigte sich, dass mit Hilfe dieses Verfahrens die gleiche Wirkung wie bei der systemischen Verabreichung von IL-10 oder Dexamethason erzielt wurde. *L. lactis* ist ein grampositives nicht-pathogenes Bakterium, das nicht zur natürlichen Darmflora gehört.

Bei der Verwendung kontraentzündlicher Cytokine, zum Beispiel Interleukin 4, zeigt sich jedoch ebenfalls ein erhebliches Nebenwirkungspotential. In einer Studie von van Dullemen et al. (Gastroenterology, 109 (1995), 129-135) zeigte sich zwar, dass bei einmaliger Anwendung eines humanisierten Anti-TNF- α -Antikörpers bei Patienten mit Morbus Crohn bei 8 bis 10 Patienten eine zumindest über einige Wochen andauernde Abheilung erreicht wurde, wobei jedoch auch starke Nebenwirkungen beobachtet wurden. Beispielsweise erfolgte eine Antikörperbildung gegen diesen hybriden Maus/Mensch-Antikörper, die

teilweise mit Serumkrankheit und gelegentlich mit der Entwicklung von Lymphomen einherging. Ebenfalls zeigte sich, dass die durch den Antikörper bewirkte irreversible Verminderung von Zellpopulationen ein 5 erhebliches immunologisches Risiko darstellt, insbesondere bei Mehrfachgabe.

Es gibt auch zahlreiche Hinweise, dass Infektionen zur Entstehung des CED-Formenkreises beitragen. So 10 üben beispielsweise Lymphocyten, die mit einem E. coli-Lipopolysaccharid-Extrakt behandelt wurden, gegenüber Epithelzellkolonien cytotoxische Aktivität aus (Shorter et al., Gastroenterology, 58 (1970), 692-698). Patienten mit Colitis ulcerosa weisen darüber hinaus häufiger hämolytische, ente- 15 rotoxische oder nekrotoxische E. coli-Stämme auf als gesunde Probanden. Eine Strategie zur Behandlung von beispielsweise Colitis ulcerosa besteht daher in der Verabreichung von Breitbandantibiotika. Bei Vancomycin wurde jedoch keine therapeutische Wirkung festgestellt. Tobramycin, dessen Aktivität hauptsächlich gegen gramnegative Bakterien 20 wie E. coli gerichtet ist, scheint allenfalls kurzzeitige Effekte bei Colitis ulcerosa zu haben.

Es wurden auch Versuche unternommen, die Darmflora 25 von CED-Patienten langfristig zu verändern. Beispielsweise wurden Colitis ulcerosa-Patienten mit Gentamicin vorbehandelt und anschließend mit dem nicht-pathogenen E. coli-Stamm (Nissle 1917) (Mu- taflor) behandelt (Rembacken et al., The Lancet, 30 354 (1999), 635-639). Es zeigte sich, dass der E. coli-Stamm eine ähnliche Wirkung wie Mesazalin (5-

Aminosalizylsäure) ausühte, wobei Remission und Dauer der Remission vergleichbar waren.

Natürliche oder rekombinante Bakterienstämme werden auch zur Behandlung anderer Krankheiten von Mensch 5 und Tier verwendet. So beschreibt die WO 99/26642 die Verwendung des nicht-pathogenen *E. coli*-Stammes DSM 6601 zur Behandlung von Diarrhoe auf dem Veterinärsektor. Vandenplas (Clin. Mikrobiol. and Infect., 5 (1999), 299-307) beschreibt die Verwendung 10 von biotherapeutischen Mitteln, insbesondere lebenden Bakterien und Hefezellen, zur Behandlung akuter und chronischer infektiöser Gastroenteritis. Paton et al. (Nature Medicine, 6 (2000), 265-270) beschreiben die Verwendung rekombinanter Bakterien, 15 beispielsweise rekombinanter *Escherichia coli*-Stämme, die auf ihrer Zelloberfläche einen Shiga-Toxin-Rezeptor bilden, zur Behandlung von Magen-Darm-Erkrankungen, die durch Shiga-Toxin-produzierende Bakterien verursacht werden. Beninati 20 et al. (Nature Biotechnology, 18 (2000), 1060-1064) beschreiben die Verwendung von zwei rekombinanten *Streptococcus gordonii*-Stämmen, die einen mikrobi ziden Einzelketten-Antikörper sezernieren und die 25 Ratten-Vagina stabil kolonisieren können, zur Behandlung einer experimentell erzeugten, *Candida albicans*-verursachten Vaginitis.

Von einigen endogenen proteolytischen Enzymen ist bekannt, dass sie direkt oder indirekt an der Pathogenese verschiedener Krankheiten des menschlichen 30 oder tierischen Körpers beteiligt sind. Endogene proteolytische Enzyme dienen vorrangig zum Abbau von eindringenden Mikroorganismen, Antigen-

Antikörper-Komplexen und bestimmten Gewebeproteinen, die der Organismus nicht mehr benötigt. Bei einem normalen gesunden Organismus werden proteolytische Enzyme in einer begrenzten Menge produziert und durch die Synthese einer Reihe von Protease-Inhibitoren reguliert. Gewebe, die insbesondere proteolytischen Attacken und Infektionen ausgesetzt sind, beispielsweise Gewebe der Atemwegsorgane, enthalten normalerweise sehr viele Protease-Inhibitoren. In bestimmten Fällen, beispielsweise schweren pathologischen Prozessen wie Sepsis oder akuter Leukämie, erhöht sich die Menge freier proteolytischer Enzyme. Eine Störung des Gleichgewichtes zwischen Proteasen und Protease-Inhibitoren kann zu einer schwerwiegenden Schädigung des betroffenen Organismus führen, indem es beispielsweise zu Protease-vermittelten Gewebezerstörungen kommt, wozu Emphysem, Arthritis, Glomerulonephritis, Periodontitis, Muskeldystrophie, Tumorinvasion und andere pathologische Zustände gehören.

Zu den bislang identifizierten Protease-Inhibitoren gehört der sekretorische Leukocyten-Protease-Inhibitor (SLPI), der Enzyme mit Serin-Protease-Aktivität hemmt. Das 12 Kilodalton-Protein ist vor allem an solchen Stellen im Körper nachgewiesen worden, wo dieser im direkten Kontakt mit seiner Umwelt steht, beispielsweise in der Ohrspeicheldrüse und in den Epithelien der Nasennebenhöhle, der Trachea und Bronchien. SLPI hemmt unter anderem menschliche Leukocyten-Elastase, Cathepsin G und menschliches Trypsin. Leukocyten-Elastase ist eine Serin-Protease von besonderem Interesse, da das Enzym bei extrazellulärer Freisetzung Bindegewebe und

damit assoziierte Proteine abbaut. Leukocyten-Elastase ist mit verschiedenen pathologischen Zuständen, beispielsweise Emphysem und Rheumatoïdarthritis, in Verbindung gebracht worden. Trypsin 5 ist ebenfalls eine Protease von besonderem Interesse, da bekannt ist, dass Trypsin den Abbau bestimmter Weichorgangewebe, beispielsweise von Pankreasgewebe während einer Pankreatitis, initiieren kann. Von Cathepsin G ist bekannt, dass diese Protease in 10 vitro eine Reihe von Proteinen abbauen kann, beispielsweise Proteine des Komplement-Stoffwechselweges. SLPI besitzt darüber hinaus antivirale, antimykotische und antibakterielle Wirkungen.

SLPI scheint auch bei der Entstehung der chronischen Gastritis eine Rolle zu spielen. So zeigen 15 Nilius et al. (in: Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases 2 (Herausgeber: Langner und Ansorge), (2000), 445-454, Kluwer Academic/Plenum Publishers), dass bei einer Helicobacter pylori-20 Infektion der Magenschleimhaut das von Epithelzellen der Magenschleimhaut gebildete und sezernierte SLPI signifikant vermindert wird.

Die Verwendung von SLPI zur Therapie verschiedener Erkrankungen ist bekannt.

25 So offenbart die US 5,633,227 ein Verfahren zur Behandlung von Mastzell-vermittelten Krankheitszuständen in Säugetieren durch Verabreichung eines pharmakologisch wirksamen SLPI-Fragmentes oder eines Muteins davon. Ebenfalls wird ein Verfahren zur Behandlung von Asthma oder allergischer Rhinopathie 30 unter Verwendung von SLPI beschrieben. Das Dokument

offenbart auch ein Verfahren zur Hemmung von Trypsin-
tase beziehungsweise Tryptase-vermittelten Krank-
heitszuständen durch Verabreichung von SLPI-
5 Peptiden oder Proteinteilen.

Die US 5,851,983 offenbart ein Polypeptid, das den
C-terminalen SLPI-Teil umfasst und somit Elastase
inhibieren kann. Ebenso werden eine dieses Polypep-
tid umfassende pharmazeutische Zusammensetzung und
10 ein Verfahren zur Behandlung von Krankheiten be-
schrieben, die entweder durch eine übermäßige Akti-
vierung von Neutrophilen hervorgerufen werden
oder die mit der neutrophilen Protease im Zusam-
menhang stehen. Dabei kann es sich beispielsweise um
15 Entzündungskrankheiten, Thrombocytenaggregations-
Thrombose und Reperfusionssschäden nach Ischämie
handeln, aber auch um Krankheiten wie chronische
Bronchitis, ARDS, Nierenentzündung, Lungenentzün-
dung etc..

20 Die WO 94/06454 beschreibt ein Verfahren zur Hem-
mung von Retrovirus-Infektionen, insbesondere In-
fektionen mit HIV, wobei SLPI-Proteine oder Analoge
oder Derivate davon verabreicht werden. Das Doku-
ment offenbart außerdem spezifische SLPI-codierende
25 Nucleotidsequenzen sowie die von diesen Sequenzen
codierten Proteine.

Die WO 99/17800 offenbart eine das SLPI-Protein um-
fassende pharmazeutische Zusammensetzung. Dieses
Arzneimittel ist besonders zur Behandlung von Atem-
30 wegserkrankungen, beispielsweise Lungenkrankheiten,
zur Behandlung von Krankheiten, die durch erhöhte

Mengen von Proteasen charakterisiert sind, sowie zur Behandlung von Leukocyten- oder Mastzell-vermittelten Krankheiten konzipiert.

Die US 6,132,990 offenbart Verfahren zur Herstellung rekombinanter Serin-Protease-Inhibitoren und DNA-Sequenzen, die dafür verwendet werden können. Das offenbarte Protein kann Chymotrypsin und Elastase hemmen, nicht jedoch Trypsin.

Die JP 07103977 A beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von SLPI und SLPI-Elastase-Komplexen unter Verwendung von gegen SLPI gerichteten Antikörpern. Das System wird insbesondere zum Nachweis von Atemwegserkrankungen verwendet.

Bezüglich des Vorkommens und der Funktion von SLPI im Darm gibt es jedoch kaum Untersuchungen, wobei die Ergebnisse teilweise sehr widersprüchlich sind. So beschreiben Bergenfeldt et al., J. Gastroenterol., 31 (1996), 18-23, eine Immunfärbung für SLPI in Epithelzellen der menschlichen Darmmucosa. Si-Taher et al., Gastroenterology, 118 (2000), 1061-1071, beschreiben eine konstitutive und regulierte Sekretion von SLPI in menschlichen Darmepithelzellen, wobei sie auch eine antibakterielle Aktivität von SLPI gegen das Pathogen *Salmonella typhimurium* zeigen. Franken et al., J. Histochem. Cytochem., 37 (1989), 493-498, berichten jedoch, dass SLPI im Verdauungstrakt nicht oder kaum vorhanden ist. In einer Untersuchung von Nystrom et al., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 57 (2) (1997), 119-125) wurde die Frage untersucht, inwieweit aus dem Speichel stammendes, verschlucktes SLPI zu der im Darm vor-

gefundenen SLPI-Menge beitragen kann. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass verschlucktes SLPI im Magen und Duodenum schnell abgebaut wird und demzufolge für inflammatorische Erkrankungen im Darmtrakt keine Rolle spielt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit das technische Problem zugrunde, Mittel, die zur Behandlung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen verwendet werden können, und Verfahren zur Herstellung und Verwendung solcher Mittel bereitzustellen, wobei die Mittel in höherem Maße als die bisher verwendeten Mittel eine Behandlung der Ursachen der CED ermöglichen und im Gegensatz zu den bisher verwendeten Mitteln eine topische Therapie ermöglichen, ohne dass die im Stand der Technik beschriebenen systemischen Nebenwirkungen auftreten.

Die vorliegende Erfindung löst dieses technische Problem insbesondere durch die Verwendung eines Wirkstoffes, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus sekretorischem Leukocyten-Protease-Inhibitor (SLPI), einem Fragment davon, einem Komplex davon, einem Derivat davon, einem Analog davon, einer den Wirkstoff SLPI oder ein Fragment oder Derivat davon codierenden, exprimierbaren Nucleinsäure und eines die Nucleinsäure enthaltenden, zur SLPI-Bildung befähigten nicht-pathogenen Mikroorganismus zur Behandlung einer Krankheit eines menschlichen oder tierischen Körpers, ausgewählt aus der Gruppe chronischer entzündlicher Darmerkrankungen (CED) bestehend aus Enteritis necroticans, Enteritis regionalis Crohn (Morbus Crohn), Colitis cystica, Colitis granulomatosa, Colitis gravis, Colitis haemorrh-.

gia, Colitis ischaemica, Colitis mucosa und Colitis ulcerosa.

Die insbesondere bei Morbus Crohn auftretenden Geschwüre mit tiefen Fissuren sprechen dafür, dass 5 bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ein proteolytischer Abbau des Darmgewebes stattfindet. Der Darm ist im Allgemeinen dadurch gekenn-10 zeichnet, dass ein schneller Stoff-Turnover an den Oberflächen stattfindet. Der Abbau und die Wiederherstellung der extrazellulären Matrix muss daher bei gesundem Gewebe einer engmaschigen Kontrolle unterliegen, um eine Erosion und Geschwürbildung und somit eine Beeinträchtigung der Darmfunktion zu verhindern. Erfindungsgemäß wurde nun mit Hilfe von 15 Immunofärbeverfahren überraschenderweise festgestellt, dass die Menge von sekretorischem Leukocyten-Protease-Inhibitor in der Darmmucosa von Morbus Crohn-Patienten gegenüber der Darmmucosa gesunder Patienten erheblich dezimiert ist. Dieser überra-20 schende Befund zeigt, dass in den Darmepithelzellen von CED-Patienten das Gleichgewicht zwischen proteolytisch wirkenden Serin-Proteasen und dem Protease-Inhibitor SLPI gestört ist. SLPI kann daher nicht seine, beispielsweise in Geweben der Atem-25 wegsorgane nachgewiesene, Schutzfunktion des Epithelgewebes ausüben, so dass proteolytische Enzyme die Darmepithelschichten abbauen können. Durch die gezielte Zuführung von SLPI in die betroffenen Organe ist es somit möglich, das Gleichgewicht zwi-30 schen dem Protease-Inhibitor und inflammatorischen Proteasen in Darmepithelzellen von Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten wiederherzustellen. Bei solchen inflammatorischen Proteasen kann es sich

beispielsweise um neutrophile Elastase, Cathepsin G und Chymasen handeln, die insbesondere aus den in der Darmmucosa von CED-Patienten verstkt auftretenden neutrophilen und eosinophilen Granulocyten 5 und Makrophagen stammen.

In einer besonders bevorzugten Ausfrungsform der Erfindung ist also vorgesehen, dass der Wirkstoff, also SLPI, ein Fragment davon, ein Komplex davon, ein Derivat davon oder ein Analog davon, zur Behandlung von CED-Erkrankungen verwendet wird, indem 10 der Wirkstoff selbst, vorzugsweise in isolierter und gereinigter Form, den betroffenen Organen zugefrt wird. Die gezielte Zuführung des Wirkstoffes, zum Beispiel SLPI selbst, in die betroffenen anatomischen Bereiche bei CED-Patienten bewirkt einen 15 Schutz der Darmoberfche vor einem Abbau durch die proteolytische Aktivität von Proteasen. Da SLPI außerdem nachgewiesenermaßen antiretrovirale, antimykotische und antibakterielle Wirkungen aufweist, 20 führt die gezielte Zuführung von SLPI in den Darm darüber hinaus zu einer Bekpfung sekundärer Infektionen, die häufig CED-Erkrankungen begleiten. Dazu gehören beispielsweise Infektionen durch Salmonellen und enterotoxigene Kolibakterien.

25 In einer weiteren besonders bevorzugten Ausfrungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass nicht der isolierte und gereinigte Wirkstoff selbst, sondern eine den Wirkstoff SLPI oder ein Fragment oder Derivat davon codierende exprimierbare Nucleinsäure, die in einem lebenden, zur SLPI-Bildung befigten, nicht-pathogenen Mikroorganismus enthalten 30 ist, zur Behandlung von Erkrankungen des CED-

Formenkreises verwendet wird. Dabei wird der nicht-pathogene Mikroorganismus, der die den Wirkstoff, zum Beispiel SLPI, codierende Nucleinsäure enthält und den Wirkstoff exprimiert, in den Darm eingeschleust, wo er vorzugsweise den Darm besiedelt und dann innerhalb des Darmlumens über einen bestimmten, vorzugsweise längeren, Zeitraum hinweg den Wirkstoff SLPI exprimiert und direkt an die Zellen der erkrankten Darmepithelien abgibt. Auf diese Weise werden die gleichen vorteilhaften Wirkungen auf erkrankte Darmbereiche erzielt, wie bei der Behandlung mit dem isolierten und gereinigten Wirkstoff selbst. Somit ist eine gezielte topische Therapie von CED-Erkrankungen möglich. Gegenüber der Behandlung mit dem isolierten und gereinigten Wirkstoff ist die Behandlung mit einem lebenden, SLPI produzierenden Mikroorganismus wesentlich kostengünstiger. Darüberhinaus wird auch die zur Behandlung erforderliche Dosis erheblich vermindert, so dass das Nebenwirkungspotential ebenfalls verringert wird.

Diese Ausführungsform bietet darüber hinaus zusätzlich mehrere Vorteile. Handelt es sich bei dem verwendeten nicht-pathogenen Mikroorganismus um einen Escherichia coli-Stamm, beispielsweise den E. coli-Stamm (Nissle 1917), so kann die vorteilhafte Wirkung von SLPI mit der im Stand der Technik beschriebenen günstigen Wirkung von E. coli (Nissle 1917) auf die Remission von CED-Erkrankungen kombiniert werden. Da durch die Mikroorganismen, beispielsweise Bakterien, kontinuierlich und über einen längeren Zeitraum hinweg eine bestimmte Menge des Wirkstoffs SLPI direkt an die betroffenen Gewe-

be abgegeben wird, ist die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes SLPI außerordentlich hoch, da pharmazeutische Faktoren, wie Herstellungsverfahren, Löslichkeit, etc., die bei herkömmlichen Arzneimitteln 5 die Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffes beeinflussen, keine Rolle spielen. Auch die präsystemische Elimination (first pass effect), das heißt der Metabolismus des Wirkstoffes SLPI, die ansonsten die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen erheblich einschränkt, spielt nur eine untergeordnete Rolle. Ein nicht zu unterschätzender Vorteil besteht ferner darin, dass die kostenintensive Isolierung und Aufreinigung des Wirkstoffes SLPI aus Bakterien oder tierischen oder menschlichen Geweben entfällt.

15 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter dem Begriff "chronische entzündliche Darmerkrankungen (CED)" chronisch-rezidivierende, spezifische Entzündungen des Darms, insbesondere Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, verstanden. Der 20 Begriff umfasst ebenfalls alle Erkrankungen, die unter den Begriff "indeterminate Colitis" bekannt sind und bei denen keine eindeutige Zuordnung zu einem bestimmten Krankheitsbild möglich ist. Der Begriff umfasst ebenfalls alle extraintestinalen 25 CED-Begleiterkrankungen, beispielsweise chronische Hepatitis, Zirrhose, Granulomatose, Urolithiasis, Amyloidose, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, Stomatitis aphthosa, Arthritis, Trommelschlegelfinger, Uveitis/Iritis, autoimmune hämolytische 30 Anämie, Vaskulitis, fibrosierende Alveolitis, Perikarditis, Hyperthyreose und dergleichen.

5 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter einem "Wirkstoff" SLPI selbst, Fragmente davon, Komplexe davon, Derivate davon oder Analoga davon verstanden, solange diese die für die erfundungsgemäße Verwendung notwendige biologische Aktivität aufweisen. Im Folgenden wird der Begriff SLPI im Allgemeinen bedeutungsgleich zu dem vorstehend genannten Begriff Wirkstoff verwendet. In Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter 10 dem Begriff "Wirkstoff" also Therapeutika verstanden, die entweder prophylaktisch oder krankheitsbegleitend eingesetzt werden können, um Krankheitszustände zu vermeiden, zu lindern oder zu beseitigen.

15 Unter "sekretorischen Leukocyten-Protease-Inhibitor (SLPI)" wird erfundungsgemäß ein eukaryontisches Protein verstanden, das eine Inhibitionswirkung auf Serin-Proteasen, insbesondere Leukocyten-Elastase, Trypsin und Cathepsin G, ausübt und darüber hinaus 20 antiretrovirale, antimykotische und antibakterielle Aktivität besitzt. Der erfundungsgemäß eingesetzte Wirkstoff SLPI kann natürlichen Ursprungs sein, beispielsweise ein aus einem eukaryontischen Gewebe, vorzugsweise aus einem Säugergewebe, bevorzugter aus einem menschlichen Gewebe isoliertes Protein. 25 Der Wirkstoff SLPI kann auch ein mit Hilfe von DNA-Rekombinationstechniken hergestelltes Protein oder synthetischen Ursprungs sein, beispielsweise ein unter Verwendung des Festphasensynthese-Verfahrens von Merrifield (Angew. Chem., 97 (1985), 30 801) hergestelltes Protein.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter "Fragmenten" Teile des SLPI-Proteins ver-

standen, die eine ausreichende Länge besitzen, um die vorstehend beschriebenen Aktivitäten ausüben zu können. Erfindungsgemäß wird unter einem Fragment von SLPI somit ein Proteinteil verstanden, der weniger Aminosäuren als natives SLPI aufweist, das heißt weniger als 132 Aminosäuren, bei dem jedoch die beiden Hauptdomänen, nämlich der Carboxy-terminale Bereich, der die Antiproteinase-Aktivität aufweist, und der Amino-terminale Bereich, der die antimikrobielle Wirkung gegen beispielsweise *Staphylococcus aureus* ausübt, erhalten sind. Vorrangig ist ein solches Fragment durch das Vorhandensein von vier Disulfidbrücken gekennzeichnet, so dass die Tertiärstruktur des Proteins im wesentlichen erhalten bleibt.

Erfindungsgemäß wird unter einem "Komplex" eine Verbindung verstanden, die neben SLPI mehrere andere Bestandteile umfasst, beispielsweise ein Multi-enzymkomplex oder ein heteromeres Protein, das aus einer geordneten Assoziation funktionell und strukturell verschiedener Enzyme einschließlich SLPI besteht, zum Beispiel ein SLPI-Elastase-1-Komplex. Erfindungsgemäß kann ein SLPI-Komplex ein natürlicher SLPI-Komplex sein. Es kann sich jedoch auch um einen in vitro hergestellten SLPI-Komplex handeln, der andere Protease-Inhibitoren, beispielsweise α_2 -Makroglobulin, α_1 -Protease-Inhibitor (α_1 -PI), α_1 -Antichymotrypsin, α_1 -Antikollagenase und α_1 -Trypsin-Inhibitor umfasst.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter "Derivaten" funktionelle Äquivalente oder Abkömmlinge von SLPI verstanden, die unter Beibe-

haltung der SLPI-Grundstruktur durch Substitution von Atomen oder Molekülgruppen beziehungsweise -resten erhalten werden und/oder deren Aminosäuresequenzen sich von der des natürlicherweise vorkommenden menschlichen oder tierischen SLPI-Proteins an mindestens einer Position unterscheiden, die aber im wesentlichen einen hohen Grad an Homologie auf der Aminosäureebene und vergleichbare biologische Aktivität aufweisen. Erfindungsgemäß umfasst 5 der Begriff "Derivat" auch Fusionsproteine, bei denen am N-terminalen Teil beziehungsweise am C-terminalen Teil funktionelle Domänen eines anderen Proteins, beispielsweise eines anderen Protease-Inhibitors, vorhanden sind. "Homologie" bedeutet 10 insbesondere eine Sequenzidentität von mindestens 80 %, vorzugsweise mindestens 85 % und besonders bevorzugt mindestens mehr als 90 %, 95 %, 97 % und 15 99 %. Der dem Fachmann bekannte Ausdruck der "Homologie" bezeichnet somit den Grad der Verwandtschaft 20 zwischen zwei oder mehreren Polypeptid-Molekülen, der durch die Übereinstimmung zwischen den Sequenzen bestimmt wird. Dabei kann eine Übereinstimmung sowohl eine identische Übereinstimmung als auch ein konservativer Aminosäureaustausch bedeuten.

25 Die Unterschiede zwischen einem Derivat und nativem SLPI können beispielsweise durch Mutationen, wie zum Beispiel Deletionen, Substitutionen, Insertionen, Anlagerungen, Basenaustausche und/oder Rekombinationen der die Aminosäuresequenzen codierenden 30 Nucleotidsequenzen entstanden sein. Selbstverständlich kann es sich dabei auch um natürlicherweise auftretende Sequenzvariationen handeln, beispiels-

weise um Sequenzen aus einem anderen Organismus oder um Sequenzen, die auf natürliche Weise mutiert wurden, oder Mutationen, die mit Hilfe üblicher, auf dem Fachgebiet bekannter Mittel, beispielsweise 5 chemische Agenzien und/oder physikalische Agenzien, gezielt in die entsprechenden Sequenzen eingeführt wurden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird 10 unter einer "SLPI oder ein Fragment oder Derivat davon codierenden, exprimierbaren Nucleinsäure" eine Nucleinsäure verstanden, die ein SLPI-Protein, Fragment oder Derivat davon codiert, das die funktionellen Domänen, insbesondere die Antiprotease-Aktivität, die antiretrovirale 15 Aktivität, die antimikrobielle Aktivität und die antimykotische Aktivität von nativem SLPI aufweist.

Bei der erfindungsgemäß verwendeten Nucleinsäuresequenz kann es sich um eine DNA- oder RNA-Sequenz in linearer oder circulärer Form 20 handeln. Die Nucleinsäure kann eine aus natürlichen Quellen, beispielsweise aus eukaryontischen Geweben, vorzugsweise aus Säugergeweben, bevorzugter aus menschlichen Geweben, isolierte Nucleinsäure sein oder synthetisch hergestellt 25 worden sein.

25 Da die SLPI-Sequenzen aus einem eukaryontischen Organismus, vorzugsweise aus einem Säuger, bevorzugter aus dem Menschen, stammen, muss die erfindungsgemäß verwendete, SLPI codierende Sequenz im Fall ihrer Verwendung in einem nicht-pathogenen Bakterium eine Form aufweisen, die ihre Expression in dem Bakterium, also einem prokaryontischen Mikroorganismus, gewährleistet. Falls die erfindungsgemäß 30

verwendete Sequenz also in einem prokaryontischen Mikroorganismus exprimierbar sein muß, wird eine aus natürlichen Quellen isolierte Nucleinsäure vorzugsweise so verändert, dass beispielsweise ihre 5 Intronsequenzen entfernt werden, da die meisten Bakterien über keine geeigneten zellulären Mechanismen zur korrekten Entfernung der Intronsequenzen verfügen. In diesem Fall werden vorzugsweise auch die nativen, ein Signalpeptid codierenden Sequenzen 10 der Nucleinsäure entfernt, da die Proteine von Bakterien, wenn überhaupt, andere Signalsequenzen als die Proteine von Eukaryonten aufweisen. Gegebenenfalls wird auch die Codon-Zusammensetzung der aus einem eukaryontischen Gewebe stammenden Nucleinsäure 15 in Abhängigkeit vom Wirtsorganismus verändert, um eine effizientere Expression des eukaryontischen Gens im prokaryontischen Wirtsorganismus zu erreichen. Es ist bekannt, dass Prokaryonten eine andere tRNA-Population besitzen als Eukaryonten und deshalb häufig andere Codons benutzen. Dieses unterschiedliche "codon usage" kann eine effiziente Expression eukaryontischer Gene in Bakterien limitieren. 20

Falls die erfindungsgemäß verwendete, SLPI codierende Sequenz in nicht-pathogenen pilzlichen Mikroorganismen, beispielsweise ascosporenbildenden Hefen wie *Saccharomyces boulardii*, verwendet werden soll, müssen ihre natürlicherweise vorhandenen Intronsequenzen gegebenenfalls entfernt werden. Hefezellen verfügen zwar über zelluläre Mechanismen zur Entfernung von Intronsequenzen, es gibt jedoch Unterschiede zu höheren Eukaryonten. Gegebenenfalls müssen auch die nativen Signalpeptid-codierenden 25 30

Sequenzen der erfindungsgemäß verwendeten Sequenz entfernt werden, da sich gezeigt hat, dass einige, jedoch nicht alle Signalsequenzen von Säugerproteinen von der Hefezelle erkannt und korrekt prozessiert werden. Eine Veränderung der Codon-Zusammensetzung bei der erfindungsgemäß verwendeten Sequenz ist jedoch nicht erforderlich, da bei Hefezellen hohe Expressionsraten von Fremdgenen, insbesondere eukaryontischen Genen, beobachtet wurden.

10 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Ausdruck "ein zur SLPI-Bildung befähigter nicht-pathogener Mikroorganismus", dass ein erfindungsgemäß verwendeter Mikroorganismus gegenüber den Makroorganismen, also Menschen oder Tieren, in 15 die er eingeschleust werden soll, nicht krankheitserregend wirkt und dass er die aus einem eukaryontischen Organismus stammende, gegebenenfalls in eine exprimierbare Form gebrachte Nucleinsäure korrekt transkribieren und translatieren kann, wobei 20 im Cytoplasma des Mikroorganismus ein Protein mit der Aktivität von SLPI erzeugt und aus dem Cytoplasma durch die Außenmembranen hindurch zumindest in den periplasmatischen Raum transportiert und vorzugsweise an die Umgebung des Mikroorganismus abgegeben wird. Erfindungsgemäß ist also vorgesehen, dass ein in betroffene Darmabschnitten von 25 CED-Patienten eingeschleuster Mikroorganismus in der Lage ist, über einen bestimmten Zeitraum hinweg ein Protein mit SLPI-Aktivität zu exprimieren und 30 direkt an die Darmepithelgewebe abzugeben. Vorzugsweise ist der nicht-pathogene Mikroorganismus also in der Lage, über einen bestimmten Zeitraum hinweg im Darm eines Menschen oder eines Tieres zu leben

und diesen gegebenenfalls zu kolonisieren. Auf diese Weise können der beobachtete SLPI-Mangel in der Darmmukosa von CED-Patienten kompensiert und die damit verbundenen klinischen Manifestationen beseitigt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfolgt die Verwendung des Wirkstoffes SLPI zur Behandlung von CED-Erkrankungen, indem der, vorzugsweise isolierte und gereinigte, Wirkstoff 10 in einer pharmazeutischen Zusammensetzung verabreicht wird. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einer "pharmazeutischen Zusammensetzung" ein zu diagnostischen, therapeutischen und/oder prophylaktischen Zwecken verwendete 15 s, natürliche oder synthetisch hergestellte Wirkstoffe umfassendes Gemisch verstanden, wobei die Wirkstoffe in einer beim Patienten gut applizierbaren Form enthalten sind. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann ein festes oder flüssiges Gemisch 20 sein. Beispielsweise kann eine SLPI umfassende pharmazeutische Zusammensetzung einen oder mehrere pharmazeutisch verträgliche Exipienten enthalten. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann weitere Zusatzstoffe, wie Stabilisatoren, Verdickungsmittel, 25 Trennmittel, Gleitmittel, Farbstoffe, Geruchsstoffe, Geschmacksstoffe, Emulgatoren oder ähnliche auf dem Fachgebiet verwendete Stoffe umfassen.

Erfnungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass der in einer pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltene, isolierte und aufgereinigte Wirkstoff an 30 einen CED-Patienten in einer Dosis verabreicht wird, die ausreicht, den Zustand der chronisch ent-

zündlichen Darmerkrankung zu heilen oder ihm vorzu-
beugen, die Progression der chronisch entzündlichen
Darmerkrankung zu stoppen und/oder die Symptome der
chronisch entzündlichen Darmerkrankung zu lindern.

5 Die Dosierung des Wirkstoffes erfolgt daher so,
dass ein optimaler arzneitherapeutischer Effekt oh-
ne wesentliche toxischen Nebenwirkungen erreicht
wird, wobei der Behandlungserfolg langfristig an-
dauert.

10 Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass
der in der pharmazeutischen Zusammensetzung enthal-
tene isolierte und aufgereinigte Wirkstoff täglich
ein- bis dreimal in einer Dosis von 1 bis 5000 mg
Wirkstoff verabreicht wird. Die Menge des an einen
15 Patienten zu verabreichenden Wirkstoffes hängt un-
ter anderem von der Darreichungsform, dem Alter,
dem Geschlecht und dem Körpergewicht des zu behan-
delnden Patienten und der Schwere der Erkrankung
ab. Die genaue Dosis, mit der ein Patient zu behan-
20 deln ist, muss daher von dem behandelnden Arzt in-
dividuell festgelegt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung
ist vorgesehen, dass der in der pharmazeutischen
Zusammensetzung enthaltene, isolierte und aufgerei-
25 nigte Wirkstoff oral verabreicht wird. Eine orale
Verabreichung des Wirkstoffes ist insbesondere bei
solchen CED-Erkrankungen bevorzugt, die den oberen
Darmtrakt, wie Duodenum oder Dünndarm, betreffen.
Vorzugsweise wird der Wirkstoff in Form einer Sus-
30 pension, Tablette, Pille, Kapsel, eines Lutschbon-
bons, Granulates, Pulvers oder einer ähnlich geeig-
neten Darreichungsform verabreicht. Obwohl sich ge-

zeigt hat, dass SLPI gegenüber Säure relativ stabil ist (Nystrom et al., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 57 (1997), 119-125), sind Arzneimittelformen bevorzugt, die eine magensaftresistente Beschichtung 5 aufweisen, so dass der Wirkstoff den Magen ungehindert passieren kann und vorzugsweise erst in den oberen Darmabschnitten in Lösung geht. Die Zusammensetzung von magensaftresistenten Beschichtungen und Verfahren für ihre Herstellung sind auf dem 10 Fachgebiet bekannt. Insbesondere sind oral zu verabreichende Arzneimittelformen bevorzugt, die einen verzögerten Wirkstoff-Freisetzungsmechanismus aufweisen, um die intestinale Schleimhaut von CED-Patienten vom Lumen her längerfristig topisch zu 15 therapieren. Aufbau und Zusammensetzung solcher Arzneimittelformen mit verzögter Wirkstofffreisetzung sind ebenfalls auf dem Fachgebiet bekannt.

In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist 20 vorgesehen, eine den isolierten und aufgereinigten Wirkstoff enthaltende pharmazeutischen Zusammensetzung rektal zu verabreichen. Eine rektale Verabreichung des Wirkstoffes ist bei der Behandlung von CED-Erkrankungen bevorzugt, die insbesondere den 25 unteren Darmbereich betreffen, beispielsweise bei Colitis ulcerosa, die stets im Rektum beginnt und sich bei vielen Betroffenen in proximaler Richtung ausbreitet. Vorzugsweise erfolgt die Verabreichung des Wirkstoffes in Form eines Suppositoriums, Clysmas, Schaums oder einer ähnlich geeigneten Darreichungsform. 30

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass der, vorzugsweise isolierte und aufgereinigte, Wirkstoff parenteral, das heißt unter Umgehung des Magen-Darm-Traktes verabreicht wird. Eine parenterale Verabreichung des Wirkstoffes kann insbesondere dann indiziert sein, wenn die Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen von einer parenteralen Ernährung begleitet wird. Diese Therapieform kann außerdem bei Kindern mit Wachstumsstörungen von Vorteil sein. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die parenterale Verabreichung des Wirkstoffes insbesondere mittels Injektionen oder Infusionen erfolgt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Behandlung eines CED-Patienten nicht mit dem isolierten und aufgereinigten Wirkstoff SLPI selbst, sondern mit einem zur SLPI-Bildung befähigten nicht-pathogenen Mikroorganismus, der eine den Wirkstoff SLPI oder ein Fragment oder Derivat davon codierende, exprimierbare Nucleinsäure enthält. Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass der nicht-pathogene Mikroorganismus in der Lage ist, den Wirkstoff vor, während oder nach der Verabreichung an einen Menschen oder ein Tier zu produzieren und den produzierten Wirkstoff nach der Verabreichung an die erkrankten Organe des Verdauungstraktes abzugeben.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass es sich bei den verwendeten nicht-pathogenen Mikroorganismen um bakterielle oder pilzliche Mikroorganismen handelt, die zu den Kommensalen von Mensch oder Tier gehören. Im

Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter "Kommensalen" nicht-pathogene Mikroorganismen verstanden, die von der Nahrung ihres Wirtes, beispielsweise eines Menschen oder Tieres, beziehungsweise dessen Absonderungen, beispielsweise Speichel oder Schleim, leben. Solche Kommensalen leben unter anderem auf den Schleimhäuten des Mundes, der Atmungs-, Harn- und Geschlechtsorgane oder im Darm. Bei erfindungsgemäß verwendeten Kommensalen handelt es sich vorzugsweise um saprophytische Mikroorganismen, nicht jedoch um parasitär lebende Kommensal-Mikroorganismen, die häufig pathogen sind.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass ein pilzlicher nicht-pathogener Kommensal-Mikroorganismus als Wirtszelle für die den Wirkstoff SLPI oder ein Fragment oder Derivat davon codierende Nucleinsäure verwendet wird. Als Wirtsorganismen zur Expression eukaryontischer Fremdgene besitzen die zu den Eukaryonten gehörenden pilzlichen Mikroorganismen, beispielsweise Hefen, gegenüber den zu den Prokaryonten gehörenden Bakterien einige entscheidende Vorteile. Beispielsweise können Hefezellen die Genprodukte eukaryontischer Gene sezernieren, das heißt die Genprodukte aus der Zelle heraus transportieren und an die Umgebung abgeben. Die Proteine können während der Sekretion glykosyliert werden. In Hefezellen lassen sich auch sehr große DNA-Fragmente clonieren. Hefezellen sind daher in besonderem Maße zur Clonierung und Expression von SLPI und dessen Abgabe an die Darmepithelien geeignet.

- 30 -

Vorzugsweise gehört der pilzliche Mikroorganismus zu der Gattung *Saccharomyces*, das heißt zu Ascosporen bildenden Hefen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem erfindungsgemäß verwendeten pilzlichen nicht-pathogenen Kommensal-Mikroorganismus um *Saccharomyces boulardii*.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass die nicht-pathogenen Mikroorganismen zur natürlichen Darmflora von Mensch oder Tier gehören. Dies ist insofern besonders vorteilhaft, als die Darmflora der Patienten nicht mit Keimen infiltriert wird, deren Einfluß auf die Zusammensetzung der natürlichen Darmflora beziehungsweise das mit CED-Erkrankungen im Zusammenhang stehende pathologische Geschehen unbekannt beziehungsweise schwer einzuschätzen ist. Ein besonderer Vorteil besteht außerdem darin, dass die erfindungsgemäß verwendeten Mikroorganismen physiologisch sehr gut an die speziellen Bedingungen innerhalb des Säugerdarms angepaßt sind, so dass die erfindungsgemäß eingesetzten Mikroorganismen erfolgreich mit den natürlicherweise im Darm des Patienten vorkommenden Keimen um Nährstoffe konkurrieren können. Somit ist ein längerfristiges Überleben der erfindungsgemäß eingesetzten Mikroorganismen und eine damit einhergehende längerfristige Expression des Wirkstoffs SLPI gewährleistet. Darüberhinaus vermitteln Mikroorganismen der normalen Darmflora eine Schutzinfektion gegen pathogene oder opportunistische Mikroorganismen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass es sich bei dem verwendeten

nicht-pathogenen Mikroorganismus um ein aerobes oder anaerobes gramnegatives Bakterium der natürlichen Darmflora von Mensch oder Tier handelt. Vorrangig gehört das erfindungsgemäß verwendete gramnegative Wirsbakterium zu der Gattung *Escherichia*, *Pseudonomas*, *Bacterioides* oder *Proteus*.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei den eingesetzten gramnegativen Wirsbakterien um den Stamm *Escherichia coli* (Nissle, 1917), der *Escherichia coli* DSM 6601 entspricht. Dieser Stamm ist für den Menschen nicht-pathogen. Von *E. coli* Nissle, 1917 (Serotyp O6:K5:H) ist bekannt, dass dieser Stamm antagonistische Aktivitäten gegen verschiedene pathogene und nicht-pathogene Enterobakterien zeigt. Die antagonistische Aktivität von *E. coli* (Nissle 1917) ist wahrscheinlich auf die Produktion von Bakteriozinen oder Mikrozinen zurückzuführen (Blum, Marre und Hacker, *Infection*, 23 (1995), 234-236), kann aber auch mit der Blockierung von Rezeptoren der Darmmucosa im Zusammenhang stehen (Rembacken et al., *The Lancet*, 354 (1999), 635-639). Von *E. coli* (Nissle 1917) ist darüber hinaus bekannt, dass mit diesem Stamm behandelte Colitis ulcerosa-Patienten Remissionen zeigten, die mit denen des Arzneimittels Mesalazin vergleichbar waren, ohne dass jedoch die von Mesalazin bekannten Nebenwirkungen auftraten (Rembacken et al., *The Lancet*, 354 (1999), 635-639). Der Stamm *E. coli* (Nissle 1917) bietet also den besonderen Vorteil, dass die günstige Wirkung des Wildtyp-Stammes auf den Krankheitsverlauf von CED-Erkrankungen mit der erfindungsgemäßen vorteilhaften Wirkung einer SLPI-Zuführung auf den Hei-

lungsprozeß von CED-Krankheitsverlauf kombiniert werden kann. *E. coli* (Nissle 1917) ist im Handel unter der Bezeichnung "Mutaflor" von Ardeypharm GmbH, Herdecke, Deutschland erhältlich. *Escherichia coli* bietet darüber hinaus den großen Vorteil, dass es der am besten erforschte Mikroorganismus ist, der am häufigsten für gentechnische Experimente verwendet wird. Für dieses Bakterium wurden sehr viele gentechnische Verfahren und Clonierungsvektoren entwickelt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass es sich bei dem verwendeten nicht-pathogenen Mikroorganismus um ein aerobes oder anaerobes grampositives Bakterium der natürlichen Darmflora handelt. Es ist bekannt, dass die normale Darmflora von vielen grampositiven Bakterien besiedelt wird, zu denen beispielsweise *Bifidobacterium*-, *Streptococcus*-, *Staphylococcus*- und *Corynebacterium*-Arten zählen. Beispielsweise gilt *Bifidobacterium bifidum* als häufigster Darmbewohner von Brustkindern, stellt aber auch einen wesentlichen Anteil der normalen Darmflora von Flaschenkindern und Erwachsenen sowie möglicherweise aller Warmblüter dar. Als Wirtsorganismen zur Expression eukaryontischer Gene besitzen grampositive Bakterien gegenüber gramnegativen Bakterien den entscheidenden Vorteil, dass sie die Genprodukte eukaryontischer Gene sezernieren können, das heißt die Genprodukte aus der Zelle heraus transportieren und an die Umgebung abgeben können. Grampositive Wirtsbakterien sind daher in besonderem Maße auch zur Expression von SLPI und Abgabe an die Darmepithelien geeignet.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst daher die Verwendung von grampositiven Bakterien der Gattungen *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* und *Corynebacterium* 5 als Wirtsbakterium für die den Wirkstoff SLPI oder ein Fragment oder Derivat davon codierende Nucleinsäure. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem verwendeten grampositiven Wirtsbakterium um *Streptococcus gordonii*, das 10 ein nicht-pathogenes und natürlicherweise transformierbares Kommensalbakterium ist (vergleiche Beninati et al., *Nature Biotechnology*, 18 (2000), 1060-1064).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der 15 Erfindung ist vorgesehen, dass zur Expression der den Wirkstoff SLPI codierenden Nucleinsäure nicht-pathogene Mikroorganismen verwendet werden, die nicht zur natürlichen Darmflora gehören oder keine Kommensalen von Mensch oder Tier sind, sofern sie 20 zur Bildung von SLPI befähigt sind und gegenüber dem Wirt, in den sie eingeführt werden sollen, nicht-pathogen sind. Vorzugsweise handelt es sich bei solchen Mikroorganismen um Bakterien, die zumindest über einen bestimmten Zeitraum im Darm von 25 Mensch oder Tier leben können. Solche Bakterien dürfen darüber hinaus keine nachteilige Wirkung auf den Verlauf einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung oder auf die therapeutische Wirkung von SLPI ausüben. Bevorzugte Beispiele für Bakterien, 30 die nicht zur natürlichen Darmflora gehören oder keine Kommensalen sind, die erfindungsgemäß jedoch als Wirtszellen für eine den Wirkstoff SLPI oder ein Fragment oder Derivat davon codierende, expri-

mierbare Nucleinsäure verwendet werden können, umfassen Bakterien, die zur fermentativen Herstellung von Lebensmitteln eingesetzt werden. Besonders bevorzugte Beispiele sind Milchsäurebakterien, wie

5 Lactococcus lactis, Lactobacillus delbrueckii subspec. bulgaricus, Lactobacillus caucasicus, Lactobacillus casei, Lactobacillus kefir, Streptococcus thermophilus, einige Leuconostoc-Arten und ähnliche.

10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden zur Expression der den Wirkstoff SLPI codierenden Nucleinsäure Mutanten der erfindungsgemäß verwendeten nicht-pathogenen Mikroorganismen eingesetzt, bei denen die äußere Zellhülle verändert ist, so dass bestimmte exprimierte Proteine die Zelle verlassen und in die Umgebung der Zelle gelangen können. Solche Mutanten werden auch als "leaky-Mutanten" bezeichnet. Leaky-Mutanten mit veränderter Zellhülle können mit Hilfe bekannter Verfahren erhalten werden, wie beispielsweise Mutagenese-Verfahren unter Verwendung von Nitrosoguanidin. Beispiele für unterschiedliche Typen von Leaky-Mutanten sind von Anderson, Wilson und Oxender in J. Bacteriol., 140 (1979), 351-358, und Fung, MacAlister und Rothfield in J. Bacteriol., 133 (1978), 1467-1471 beschrieben. Die Verwendung von Leaky-Mutanten als Wirtszellen für die den Wirkstoff SLPI codierende Nucleinsäure bietet also insbesondere den Vorteil, dass eine Abgabe des exprimierten SLPI-Proteins an die Umgebung, das heißt die Darmepithelien des CED-Patienten, gewährleistet ist.

15

20

25

30

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform können Spheroblasten, L-Formen oder Protoplasten von gramnegativen beziehungsweise grampositiven Wirtsbakterien oder von pilzlichen Wirtszellen verwendet werden. Bakterielle Spheroblasten sind Zellen, die durch Behandlung von gramnegativen Bakterien mit Lysozym erhalten werden. Bakterielle Protoplasten sind Zellen, die durch Behandlung grampositiver Bakterien mit Lysozym erhalten werden.

5 Spheroblasten können auch mit Hilfe einer Behandlung mit Penicillin oder Lysozym-EDTA gewonnen werden. L-Formen gramnegativer oder grampositiver Bakterien sind dadurch gekennzeichnet, dass sie die Fähigkeit zur Bildung einer funktionellen Zellwand verloren haben. Verfahren zum Erhalt von bakteriellen L-Formen sind beispielsweise von Makemson und Darwish, Infect. Immun., 6 (1972), 880, beschrieben. Auch von Hefezellen können Spheroblasten mittels wohlbekannter Verfahren erhalten werden.

10

15

20 Erfnungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass die in dem nicht-pathogenen Mikroorganismus enthaltene, SLPI oder ein Fragment oder Derivat davon codierende Nucleinsäure in einem Vektor insertiert ist. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfnung bedeutet der Begriff "Vektor" eine extrachromosomal DNA, bei der es sich vorzugsweise um ein Plasmid, ein Cosmid, einen Bakteriophagen, ein Virus, einen Shuttle-Vektor und einen anderen üblicherweise in der Gentechnik verwendeten Vektor handelt.

25

30 Die erfungsgemäßen Vektoren können weitere Funktionseinheiten besitzen, die eine Stabilisierung, Selektion und/oder Replikation des Vektors in einem

Wirtsorganismus bewirken oder zumindest dazu beitragen.

Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass im Gegensatz zu den üblicherweise zur Clonierung von Gensequenzen verwendeten Vektoren der erfindungsgemäß zur Insertion von SLPI-Sequenzen verwendete Vektor keinen Selektionsmarker enthält, der auf einer Antibiotikaresistenz beruht. Da die Wirtszelle, in die der Vektor zur Expression des Wirkstoffs eingeführt wird, über einen bestimmten Zeitraum hinweg stabil den Darm eines CED-Patienten besiedeln soll, bestünde ansonsten die Gefahr, dass eine auf dem Vektor enthaltene Antibiotikaresistenz an die anderen Keime der Darmflora weitergegeben wird und sich somit innerhalb der Darmflora ausbreiten kann.

Erfindungsgemäß ist daher vorgesehen, dass der auf dem Vektor in bevorzugter Ausführung enthaltene Selektionsmarker ein Gen ist, dessen Genprodukt für den menschlichen oder tierischen Organismus nicht schädlich ist und das sich leicht nachweisen lässt. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem auf dem Vektor enthaltenen Selektionsmarker um eine das "green fluorescent protein" (GFP) codierende Sequenz, wobei der Nachweis des GFP-Produktes beispielsweise mittels FACS oder Durchflusscytometrie erfolgt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die den Wirkstoff SLPI oder ein Fragment oder Derivat davon codierende Nucleinsäure so in einen Vektor insertiert, dass sie unter der

funktionellen Kontrolle von mindestens einem regulatorischen Element steht, das die Transkription der Nucleinsäure in eine translatierbare RNA und/oder die Translation der RNA in ein Protein 5 vor, während oder nach der Verabreichung gewährleistet.

Regulatorische Elemente können beispielsweise Promotoren, Ribosomenbindungsstellen, Signalsequenzen und/oder Transkriptionsterminationssignale sein. 10 Regulatorische Elemente, die mit einer SLPI oder ein Fragment oder Derivat davon codierende Nucleinsäure funktionell verbunden sind, können Nucleotidsequenzen sein, die aus anderen Organismen oder anderen Genen stammen als die SLPI codierende Nucleotidsequenz selbst. 15

Erfindungsgemäß kann es sich bei dem verwendeten Promotor um einen konstitutiven oder induzierbaren Promotor handeln. Ein Promotor ist der Bereich einer DNA, an den das Enzym RNA-Polymerase bindet und den Prozess der Gentranskription initiiert. Ein "konstitutiver Promotor" ist ein nicht-regulierbarer Promotor, der ohne Stimulus von außen kontinuierlich die Transkription einer codierenden DNA-Sequenz bewirkt. Ein "induzierbarer Promotor" 20 ist ein regulierbarer Promotor, der direkt durch die Gegenwart oder die Abwesenheit eines chemischen Mittels oder indirekt durch einen Stimulus aus der Umgebung wie eine Temperaturveränderung aktiviert wird. Ein konstitutiver Promotor weist gegenüber einem induzierbaren Promotor insofern einen Nachteil auf, als eine nicht-kontrollierte Expression 25 eines Fremdproteins, beispielsweise in einer bakte- 30

riellen Wirtszelle, zum Absterben dieser Wirtszellen führen kann.

Erfindungsgemäß ist daher insbesondere die Verwendung eines induzierbaren Promotors zur Expression 5 der SLPI codierenden Nucleinsäure vorgesehen. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein induzierbarer Promotor verwendet, der durch Nährstoffmangel induzierbar ist. Ein durch Nährstoffmangel induzierbarer Promotor wird dann 10 aktiviert, wenn die Konzentration eines chemischen Mittels, das für den Erhalt von Zellfunktionen notwendig ist, stark reduziert ist oder vollkommen fehlt. Ein solcher Promotor ist insbesondere für 15 die spezifischen Wachstumsbedingungen geeignet, mit denen Keime im Darm konfrontiert werden. Im Darm unterliegt die Nährstoffversorgung der Keime äußerst starken Schwankungen. Die Wachstumsbedingungen im Darm werden daher häufig als "feast or famine" beschrieben. Wenn also Nährstoffmangel im Darm 20 herrscht, das heißt wenn der Darm wenig oder keinen Speisebrei enthält, wird durch den erfindungsgemäß verwendeten induzierbaren Promotor die Transkription der SLPI codierenden Nucleinsäure induziert. Das anschließend gebildete SLPI-Protein kann nach 25 Ausschleußung aus der erfindungsgemäß verwendeten Wirtszelle relativ ungehindert zu den Darmepithelien diffundieren, da der Darm wenig oder keinen Speisebrei enthält.

Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass 30 zur Expression der SLPI codierenden Nucleinsäure in einem gramnegativen Wirtsbakterium, beispielsweise *E. coli* (Nissle 1917), ein induzierbarer Promotor

verwendet wird, der durch Phosphatmangel induziert wird. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem verwendeten Promotor um den phoA-Promotor von *Escherichia coli*. Falls 5 der Vektor den phoA-Promotor enthält, umfaßt er vorzugsweise auch die Regulationsgene phoB und phoR, um den Promotor effizient ein- und ausschalten zu können. In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den zur 10 Wirkstoff-Expression in einem gramnegativen Wirtsbakterium verwendeten Promotoren um die trp-, lac- oder tac-Promotoren von *Escherichia coli*. Die Promotoren von *E. coli* lassen sich prinzipiell auch in grampositiven Bakterien verwenden.

15 Erfnungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass zur Expression der SLPI codierenden Nucleinsäure in einer Hefezelle, beispielsweise *Saccharomyces boullardii*, ein induzierbarer Promotor verwendet wird, der durch Phosphatmangel induziert wird. In einer 20 besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem verwendeten Promotor um den Promotor des Hefe-Gens PHO 5. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, zur Expression der 25 SLPI codierenden Nucleinsäure in einer Hefezelle den Promotor des ADH 1-Gens der Hefe zu verwenden, der durch Glucose-Mangel induziert wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass die SLPI codierende Nucleinsäure zur Expression in einer bakteriellen Wirtszelle unter die funktionelle Kontrolle einer Ribosomen-Bindungsstelle gestellt wird. Im Zusammenhang 30 mit der vorliegenden Erfindung wird unter dem Beg-

riff "Ribosomen-Bindungsstelle" eine Sequenz verstanden, die zum 3'-Ende der bakteriellen 16S-rRNA komplementär ist und zur Bindung von Ribosomen dient. Ribosomen-Bindungsstellen sind normalerweise 5 3 bis 12 Basen vor einem Initiationscodon lokalisiert, wobei sie üblicherweise 3 bis 9 Basen umfassen. Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass es sich bei der verwendeten Ribosomen-Bindungsstelle um eine Shine-Dalgarno-Sequenz mit 10 der Konsensussequenz 5'-AAGGAGGU-3' handelt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass die SLPI codierende Nucleinsäure zur Expression in einer erfindungsgemäßen Wirtszelle mit einer für den jeweiligen Wirt geeigneten Signalsequenz, das heißt mit einer bakteriellen oder pilzlichen Signalsequenz, verbunden wird. Eine "Signalsequenz" ist eine Sequenz, die ein Signalpeptid codiert, das die Sekretion eines Proteins aus dem Cytoplasma eines Mikroorganismus 15 in den periplasmatischen Raum oder in die Umgebung des Mikroorganismus bewirkt. Das Signalpeptid ist ein kurzes Segment von etwa 15 bis 30 Aminosäuren, das am N-Terminus von sezernierten und exportierten Proteinen lokalisiert ist. Die zelluläre Maschinerie der Wirtszelle zur Prozessierung von Proteinen 20 erkennt diese Signalsequenz, so dass das exprimierte Protein durch die Zellmembran oder durch die Membran einer Organelle sezerniert wird, wobei das Signalpeptid während des Sekretionsprozesses durch 25 eine spezifische Protease entfernt wird. Da SLPI ein normalerweise von einem eukaryontischen Organismus sezerniertes Protein ist, wird das natürliche Signalpeptid des nativen SLPI-Proteins erfin- 30

dungsgemäß durch ein für die jeweilige Wirtszelle geeignetes Signalpeptid ersetzt, so dass der Transport aus der Wirtszelle heraus in den periplasmatischen Raum oder die Umgebung der Wirtszelle gewährleistet ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist insbesondere vorgesehen, dass zur Expression der SLPI codierenden Nucleinsäure in einem gramnegativen Wirtsbakterium, beispielsweise *E. coli* (Nissle 1917), die Signalsequenz des β -Lactamase-Gens von *E. coli* oder die Signalsequenz des *ompA*-Gens von *E. coli* verwendet wird, um eine Sekretion des exprimierten SLPI-Proteins in den periplasmatischen Raum und/oder die Umgebung zu erreichen. Erfindungsgemäß ist es auch möglich, Hybrid-Signalsequenzen zu verwenden, beispielsweise die von Konrad, *Annals New York Academy of Sciences*, 413 (1983), 12-22) beschriebene Sequenz, die aus einer Fusion der ersten zwölf Aminosäuren der β -Lactamase-Signalsequenz mit den letzten 13 Aminosäuren der Insulin-Signalsequenz des Menschen besteht.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass zur Expression der SLPI codierenden Nucleinsäure in einem grampositiven Wirtsbakterium, beispielsweise *Streptococcus gordonii*, die Signalsequenz des α -Amylase-Gens von *Bacillus amyloliquefaciens* oder die Signalsequenz des *Streptococcus*-Gens M6 verwendet wird, um eine Sekretion des exprimierten SLPI-Proteins durch die Zellhülle hindurch in die Umgebung zu erreichen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass zur Expression der SLPI codierenden Nucleinsäure in einer pilzlichen Wirtszelle, beispielsweise *Saccharomyces boulardii*,

5 die Signalsequenz des α -Faktors von Hefen oder die Signalsequenz des Killertoxins von Hefen verwendet werden, um eine Sekretion des exprimierten SLPI-Proteins durch die Zellhülle hindurch in die Umgebung zu erreichen.

10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass die zur SLPI-Expression befähigte lebende mikrobielle Wirtszelle, die in einen Vektor insertierte, SLPI codierende Nucleinsäure enthält, in einer pharmazeutischen Zusammensetzung an einen CED-Patienten verabreicht wird. Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass die pharmazeutische Zusammensetzung ausreichend koloniebildende Einheiten (CFU) der zur SLPI-Bildung befähigten Wirtszelle enthält, so dass bei mehrmaliger Verabreichung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung an einen CED-Patienten der Zustand der chronisch entzündlichen Darmerkrankung geheilt, die Progression der chronisch entzündlichen Darmerkrankung gestoppt und/oder die Symptome der chronisch entzündlichen Darmerkrankung gelindert werden können. Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass eine pharmazeutische Zusammensetzung 1×10^8 - 1×10^{11} , vorzugsweise 1×10^9 - 1×10^{10} CFU der erfindungsgemäßen Wirtszellen enthält.

30

Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass die pharmazeutische Zusammensetzung, die den zur

SLPI-Bildung befähigten Mikroorganismus enthält, über einen Zeitraum von zwei bis vier Wochen täglich ein- bis dreimal verabreicht wird. Die genaue Dosierung hängt unter anderem von der Darreichungsform, dem Alter, dem Geschlecht und dem Körpergewicht des zu behandelnden Patienten und der Schwere der Erkrankung ab und muss vom behandelnden Arzt individuell festgelegt werden.

Vorzugsweise handelt es sich bei der pharmazeutischen Zusammensetzung, die die erfindungsgemäße lebende mikrobielle Wirtszelle enthält, um eine orale Darreichungsform. Die oral zu verabreichende pharmazeutische Zusammensetzung kann eine flüssige oder feste Form aufweisen. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann beispielsweise in Form einer Suspension, Tablette, Pille, Kapsel, eines Granulates oder Pulvers oral verabreicht werden.

In einer flüssigen pharmazeutischen Zusammensetzung liegt der erfindungsgemäße lebende Mikroorganismus vorzugsweise frei und nicht-immobilisiert in Suspension vor. Die Suspension weist eine Zusammensetzung auf, die physiologische Bedingungen für den Mikroorganismus gewährleistet, so dass insbesondere der osmotische Druck innerhalb der Zelle nicht zu einer Lyse der Zelle führt. Eine flüssige pharmazeutische Zusammensetzung ist vor allem für Mikroorganismen, insbesondere Bakterien, mit intakter Zellhülle geeignet.

In einer festen pharmazeutischen Zusammensetzung können die erfindungsgemäß verwendeten Mikroorganismen in freier, vorzugsweise lyophilisierter,

Form oder in immobilisierter Form vorliegen. Beispielsweise können die erfindungsgemäßen Mikroorganismen in einer Gelmatrix eingeschlossen sein, die den Zellen physikalischen Schutz verleiht. Ein Einschluss in eine Gelmatrix ist insbesondere für Mikroorganismen geeignet, bei denen die äußere Membran vollständig oder teilweise entfernt ist, also für leaky-Mutanten, Spheroblasten, Protoplasten oder L-Formen. Solche mikrobiellen Formen sind sehr zerbrechlich und der Einschluss in die Gelmatrix sorgt für den Schutz der Zellen vor mechanischen Scherkräften.

Die erfindungsgemäßen Mikroorganismen, beispielsweise Bakterien, können in eine Gelmatrix eingeschlossen werden, indem eine konzentrierte Zelllösung mit einem gelösten Geliermittel gemischt wird und dann das Gemisch durch Nadeln mit kleinem Durchmesser hindurchläuft. Dabei werden Tropfen gebildet, die anschließend in eine Lösung fallen, die eine Gelierung des Geliermittels und somit die Bildung polymerisierter Partikel bewirkt. Beispiele und Modifikationen dieses Verfahrens sind in Brodelius und Mosbach, Adv. Appl. Microbiol., 28 (1982), 1-25, und Klein, Stock und Vorlop, Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 18 (1983) 86-91, beschrieben. Stoffe, die als Matrix zum Einschluß von Mikroorganismen verwendet werden können, umfassen Agar, Alginat, Carrageen, Agarose oder andere für den Menschen oder Tiere physiologisch geeignete Polymere, die unter physiologischen Bedingungen gellieren können.

Andere Formen der Zellimmobilisierung umfassen die Adsorption der erfindungsgemäßen mikrobiellen Wirtszellen an festen Trägern oder die Immobilisierung der erfindungsgemäßen Wirtszellen über kovalente Bindungen. Diese Verfahren sind in Navarro und Durand, Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 4 (1977), 243, beschrieben. Eine Immobilisation von erfindungsgemäßen Bakterien kann auch erreicht werden, indem die Zellen zwischen Membranen eingeschlossen werden, deren Poren kleiner als die Bakterien selbst sind, jedoch groß genug, um einen Transport der exprimierten SLPI-Proteine durch die Membran hindurch zu ermöglichen. Solche Vorrichtungen sind wohl bekannt und im Handel erhältlich (beispielsweise Amicon, Millipore und Dorr-Olivier).

Eine zur oralen Verabreichung bestimmte feste pharmazeutische Zusammensetzung, die die erfindungsgemäßen Wirtszellen in immobilisierter oder nicht-immobilisierter Form enthält, ist vorzugsweise mit einer magensaftresistenten Beschichtung versehen. Dadurch wird gewährleistet, dass die in der pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltenden lebenden Mikroorganismen ungehindert und unbeschadet den Magen passieren können und die Freisetzung der Mikroorganismen erst in den oberen Darmbereichen erfolgt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die pharmazeutische Zusammensetzung, die die lebenden erfindungsgemäßen Wirtszellen enthält, rektal verabreicht. Eine rektale Verabreichung erfolgt vorzugsweise in Form ei-

nes Suppositoriums, Klysmas oder Schaums. Die rektale Verabreichung ist insbesondere für CED-Erkrankungen geeignet, die die unteren Darmabschnitte, beispielsweise den Dickdarm, betreffen.

5 Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend mindestens eine lebende Zelle eines zur SLPI-Bildung befähigten nicht-pathogenen Mikroorganismus, der eine exprimierbare, den Wirkstoff SLPI oder ein Fragment
10 oder Derivat davon codierende Nucleinsäure enthält, wobei der nicht-pathogene Mikroorganismus vorzugsweise ein Kommensale oder ein Bestandteil der natürlichen menschlichen oder tierischen Darmflora ist und/oder zur fermentativen Herstellung von Lebensmitteln verwendet werden kann.
15

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält die pharmazeutische Zusammensetzung ein an-aerobes oder aerobes, gramnegatives oder grampositives Bakterium der natürlicher menschlichen oder tierischen Darmflora. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem in der pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltenen Mikroorganismus um eine Kommensalhefe von Mensch oder Tier. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem in der pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltenen Mikroorganismus um ein Bakterium, das zur fermentativen Herstellung von Lebensmitteln verwendet werden kann. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die pharmazeutische Zusammensetzung eine „leaky“-Mutante eines nicht-pathogenen Mikroorganismus.
20
25
30

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält die pharmazeutische Zusammensetzung Zellen des nicht-pathogenen *Escherichia coli*-Stamms Nissle 1917. In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform enthält die pharmazeutische Zusammensetzung Zellen des Kommensalbakteriums *Streptococcus gordonii*. In noch einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform enthält die pharmazeutische Zusammensetzung Zellen der Kommen-
salhefe *Saccharomyces boulardii*.

Eine besonders vorteilhafte Ausgestaltung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, in der der Mikroorganismus eine den Wirkstoff SLPI oder ein Fragment oder ein Derivat davon codierende Nucleinsäure enthält, wobei die Nucleinsäure in einem Expressionsvektor insertiert ist und wobei die Expression der Nucleinsäure unter der Kontrolle von mindestens einem regulatorischen Element steht, so dass der Wirkstoff vor, während oder nach der Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung an einem Menschen oder ein Tier exprimiert und nach der Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung an die Organe des Verdauungstraktes abgegeben wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, umfassend:

- a) Isolierung oder Synthese einer den Wirkstoff SLPI codierenden Nucleinsäuresequenz;

- b) Clonierung der SLPI codierenden Nucleinsäuresequenz in einen bakteriellen Expressionsvektor oder pilzlichen Expressionsvektor;
- c) Transformation des bei b) erhaltenen rekombinanten Expressionsvektors in eine mikrobielle Wirtszelle, wobei die Wirtszelle ein Kommensale von Mensch oder Tier oder ein natürlicher Bestandteil der menschlichen oder tierischen Darmflora ist und/oder zur fermentativen Herstellung von Lebensmitteln verwendet werden kann;
- d) Vermehrung der transformierten Wirtszelle;
- e) Herstellung eines Immobilisats, Lyophilisats oder Flüssigpräparats transformierter Wirtszellen;
- f) Mischen des/der bei e) erhaltenen Immobilisats, Lyophilisats oder Suspension transformierter Wirtszellen mit physiologisch verträglichen Excipienten, Stabilisatoren, Verdickungsmitteln, Trennmitteln, Gleitmitteln, Emulgatoren oder ähnlichen Stoffen zum Erhalt einer pharmazeutischen Zusammensetzung.

Die Isolierung einer den Wirkstoff SLPI codierenden Nucleinsäure kann mit Hilfe üblicherweise in der Gentechnik verwendeter Verfahren erfolgen (vgl. 25 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA). Da die DNA-Sequenz des menschlichen SLPI-Gens bekannt ist (vgl. US 5,851,983 und US 6,132,990), können SLPI codierende 30 Sequenzen beispielsweise aus einem eukaryontischen

Gewebe, vorzugsweise einem Säugergewebe, bevorzugter einem menschlichen Gewebe, mit geeigneten Primern unter Verwendung des Verfahrens der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und isoliert werden. Besonders bevorzugt ist eine Amplifikation unter Verwendung einer cDNA-Bank eines menschlichen Gewebes. Darüber hinaus sind die Primer vorzugsweise so konzipiert, dass die codierende SLPI-Sequenz am 5'- und 3'-Ende mit geeigneten Restriktions-

5 Schnittstellen versehen wird. Das Amplifikationsprodukt wird mit geeigneten Restriktionsenzymen gespalten und wird nach Aufreinigung, beispielsweise unter Verwendung einer Gelelektrophorese, in einen geeigneten Vektor cloniert.

10

15 In einer anderen Ausführungsform der Erfindung kann die SLPI codierende Sequenz synthetisch hergestellt werden. Die chemische Synthese der Nucleinsäure bietet den Vorteil, dass die Nucleinsäuresequenz beispielsweise bezüglich der Codonverwendung modi-

20 fiziert werden kann, ohne die Aminosäuresequenz des codierten Proteins zu verändern. Die Synthese von DNA-Sequenzen kann beispielsweise unter Verwendung des Phosphotriester-Verfahrens oder des Phosphit-

25 verfahrens, beispielsweise an Festphasensystemen, erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Synthese unter Verwendung von DNA-Synthese-Vorrichtungen, beispielsweise DNA-Syntheseautomaten von Applied Bio-

30 systems. Nach Aufreinigung der synthetisierten Sequenz wird diese unter Verwendung geeigneter Verfahren in einen Vektor insertiert.

Die Insertion der entweder mittels Amplifikation oder mittels Synthese gewonnenen, SLPI codierenden

Nucleinsäuresequenz in einen geeigneten Vektor erfolgt unter Verwendung von üblicherweise auf dem Fachgebiet verwendeten Verfahren, beispielsweise Restriktionsspaltung und Ligierung. Ein geeigneter

5 Vektor muss generell über folgende Eigenschaften verfügen:

a) er muss die zu insertierende Nucleinsäure in einer definierten Position und Orientierung integrieren können;

10 b) er muss mit der integrierten Nucleinsäure in einen Wirtsorganismus eindringen, das heißt Zellwand und Zellmembran unversehrt passieren können;

15 c) er muss sich in der Wirtszelle als Replikon verhalten, das heißt als selbständiges genetisches Element; und

d) der Vektor muss sich bei einer Zellteilung verdoppeln können, damit alle Nachkommen mindestens eine Kopie des Vektors erhalten.

20 Geeignete Vektoren für gramnegative oder grampositive Wirtszellen beziehungsweise Hefe-Wirtszellen sind auf dem Fachgebiet bekannt. Wie vorstehend erwähnt, enthält der Vektor, der erfindungsgemäß zur Clonierung der SLPI codierenden Nucleinsäure verwendet wird, keinen Selektionsmarker, der auf einer Antibiotika-Resistenz beruht, sondern vorzugsweise einen Marker wie eine das GFP-Protein codierende Gensequenz, deren Genprodukt mittels FACS oder Durchflußcytometrie leicht nachweisbar ist. Vorzugsweise enthält der Vektor auch bereits eine Ex-

25

30

pressionskassette mit einem geeigneten Promotor, einer geeigneten Ribosomenbindungsstelle, einer geeigneten Signalsequenz und geeigneten Transkriptionsterminationssequenzen.

- 5 Nach der Insertion der SLPI codierenden Nucleinsäure in einen geeigneten Vektor wird das Konstrukt in einen bakteriellen Wirtsorganismus oder einen Hefe-Wirtsorganismus eingeführt. Handelt es sich bei dem Vektor um einen Bakteriophagen, kann dieser mittels
- 10 Transduktion in den Wirt eingeführt werden (vgl. Sambrook et al., 1989). Handelt es sich bei dem verwendeten Vektor um ein Plasmid, kann dieses beispielsweise mittels eines Transformationsverfahrens in den Wirt eingeschleust werden. Für Escherichia
- 15 coli-Stämme wird vorzugsweise das übliche Calcium-Transformationsverfahren verwendet (vgl. Sambrook et al., 1989). Transformationsverfahren für Strep-tococcus-Zellen sind beispielsweise in Clewell, Microbiol. Rev., 45 81984), 409, beschrieben.
- 20 Transformationsverfahren für pilzliche Wirtszellen, beispielsweise Hefe-Wirtszellen, sind auf dem Fachgebiet ebenfalls wohlbekannt.

Nach der Transformation werden transformierte Wirtszellen in einem geeigneten Medium unter geeigneten Bedingungen gezüchtet und vermehrt, bis eine geeignete Zelldichte erreicht ist.

Zur Herstellung einer oral zu verabreichenden Suspension werden die Wirtszellen danach in einer sterilen physiologischen Lösung in einer geeigneten Zelldichte suspendiert. Die kultivierten Wirtszellen können aber auch unter Verwendung bekannter

Verfahren lyophilisiert oder immobilisiert werden. Nach Lyophilisierung oder Immobilisierung werden die Zellen in einer geeigneten CFU (koloniebildende Einheit)-Menge mit Stoffen wie pharmazeutisch vertraglichen Exipienten, Stabilisatoren, Verdickungsmitteln, Trennmitteln, Gleitmitteln, Farbstoffen, Geruchsstoffen, Geschmacksstoffen, Emulgatoren oder ähnliche pharmazeutisch verwendeten Stoffen versetzt, um eine gewünschte pharmazeutische Zusammensetzung herzustellen.

Die vorliegende Erfindung betrifft nicht nur die vorgenannten Verwendungen des Wirkstoffes oder eines zur Wirkstoffbildung befähigten Mikroorganismus zur Behandlung einer vorstehend definierten Krankheit, sondern auch die Verwendung eines vorstehend definierten Wirkstoffes oder eines zur Bildung dieses Wirkstoffes befähigten Mikroorganismus zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur Behandlung einer Krankheit eines menschlichen oder tierischen Körpers ausgewählt aus der Gruppe chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, die vorstehend näher definiert wurden.

Die Erfindung wird durch die folgenden Figuren und das Beispiel näher erläutert.

Figur 1 zeigt die Immunfärbung eines histologischen Darmschnitts eines gesunden Patienten unter Verwendung eines spezifisch gegen menschlichen SLPI gerichteten Kaninchen-Antikörpers.

Figur 2 zeigt die Immunfärbung eines histologischen Darmschnitts eines CED-Patienten unter Verwendung

eines spezifisch gegen menschlichen SLPI gerichteten Kaninchen-Antikörpers.

Beispiel

5 **Nachweis von SLPI in Darmgewebeproben gesunder und erkrankter Patienten**

Darmgewebeproben gesunder und erkrankter Patienten wurden endoskopisch gewonnen und sofort in Einbettmedium für Gefrierschnitte (OCT, Miles Scientific) überführt und danach in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus den so eingebetteten Proben wurden Gefrierschnitte hergestellt und immunhistologisch gefärbt.

10 Zur Färbung wurden die so hergestellten Gefrierschnitte über Nacht luftgetrocknet und dann 10 min mit Aceton-Methanol-Formaldehyd (AMF) bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die fixierten Gefrierschnitte dreimal mit Tris-HCl-Puffer, pH-Wert 7,4 - 7,6, über jeweils 5 min gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte einer 30-minütigen 15 Serumblockierung unterworfen. Danach wurden die Schnitte mit einem ersten Antikörper (polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der gegen menschliches SLPI gerichtet war) in einer Verdünnung von 1:1000 bis 20 1:2000 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschen mit Tris-HCl-Puffer, pH-Wert 7,4 - 7,6, über jeweils 5 min wurden die Schnitte mit einem zweiten Antikörper (biotinylierter anti-rabbit-Ziegen-Antikörper; Vector ABC-Kit) 30 min 25 bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut dreimal gewaschen, wie vorstehend 30

beschrieben. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit Vector-ABC-Reagens. Danach wurden die Schnitte erneut dreimal gewaschen. Dann wurde alkalische Phosphatase mit Substrat entwickelt

5 (Vector Red-Alkalische Phosphatase-Substrat-Kit I). Dabei wurden SLPI-positive Zellen rot gefärbt. Die Farbentwicklung wurde nach 20 bis 30 min mit Leitungswasser gestoppt, wobei eine 10-minütige Spülung mit Leitungswasser durchgeführt wurde. An-

10 schließend erfolgte eine 10-minütige Gegenfärbung mit 0,1% Hämatoxillin. Überschüssige Farbe wurde durch 10-minütiges Spülen mit Leitungswasser entfernt. Dann wurden die Schnitte luftgetrocknet, eingedeckelt und ausgewertet.

15 Wie beispielsweise auch in Figur 1 (insbesondere untere beiden Zellen) zu sehen ist, sind die Zellen der Darmmucosa gesunder Probanden intensiv (im Originalfoto: rot) gefärbt. Diese intensive Rotfärbung zeigt, dass SLPI in der Darmmucosa gesunder Proban-

20 den in sehr großer Menge vorhanden ist. Im Gegensatz dazu sind die Zellen der Darmmucosa von CED-Patienten kaum gefärbt (vergleiche Figur 2). Diese geringe Färbung zeigt, dass die SLPI-Menge in der Darmmucosa von CED-Patienten im Vergleich zur Darm-

25 mucosa gesunder Probanden stark vermindert ist. Diese beobachtete starke Verminderung der SLPI-Menge in der Darmmucosa von CED-Patienten ist ein Hinweis auf die Eignung von SLPI zur Therapie chro-nisch-entzündlicher Darmerkrankungen.

Ansprüche

1. Verwendung eines Wirkstoffes ausgewählt aus der 5 Gruppe bestehend aus sekretorischem Leukocyten-Protease-Inhibitor (SLPI), einem Fragment davon, einem Komplex davon, einem Derivat davon, einem Analog davon, einer den Wirkstoff SLPI oder ein Fragment oder Derivat davon codierenden, exprimier-10 baren Nucleinsäure und eines die Nucleinsäure ent- haltenden, zur SLPI-Bildung befähigten nicht-pathogenen Mikroorganismus zur Behandlung einer Krankheit eines menschlichen oder tierischen Kör-15 pers ausgewählt aus der Gruppe chronischer entzünd- licher Darmerkrankungen (CED) bestehend aus Enteritis necroticans, Enteritis regionalis Crohn (Morbus Crohn), Colitis cystica, Colitis granulomatosa, Co- litis gravis, Colitis haemorrhagia, Colitis ischae- mica, Colitis mucosa und Colitis ulcerosa.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Behandlung durch Verabreichung des isolierten und gereinigten Wirkstoffs in einer pharmazeutischen Zusammenset-20 zung erfolgt.
3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei der Wirkstoff 25 in einer Dosis verabreicht wird, die ausreicht, den CED-Zustand zu heilen oder ihm vorzubeugen, die CED-Progression zu stoppen und/oder die CED- Symptome zu lindern.

- 56 -

4. Verwendung nach Anspruch 2 oder 3, wobei der Wirkstoff täglich ein- bis dreimal in einer Dosis von 1 bis 5000 mg Wirkstoff verabreicht wird.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, wo-
bei der Wirkstoff oral verabreicht wird.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei der Wirkstoff in Form einer Suspension, Tablette, Pille, Kapsel, eines Lutschbonbons, Granulats oder Pulvers verab-
reicht wird.
- 10 7. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, wo-
bei der Wirkstoff rektal verabreicht wird.
8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei der Wirkstoff in Form eines Suppositoriums, Klysmas oder Schaums verabreicht wird.
- 15 9. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, wo-
bei der Wirkstoff parenteral verabreicht wird.
10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei der Wirkstoff in Form einer Injektion oder Infusion verabreicht wird.
- 20 11. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der nicht-
pathogene Mikroorganismus in der Lage ist, den Wirkstoff vor, während oder nach der Verabreichung an einen Menschen oder ein Tier zu produzieren und den produzierten Wirkstoff nach der Verabreichung an die Organe des Verdauungstraktes abzugeben.
- 25 12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei der nicht-
pathogene Mikroorganismus ein bakterieller oder

pilzlicher Mikroorganismus ist, der zu den Kommen-salen von Mensch oder Tier gehört.

13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei der pilzli-che Mikroorganismus zu der Gattung *Saccharomyces* 5 gehört.

14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei der pilzli-che Mikroorganismus *Saccharomyces boulardii* ist.

15. Verwendung nach Anspruch 12, wobei der nicht-pathogene Mikroorganismus zur natürlichen Darmflora 10 von Mensch oder Tier gehört.

16. Verwendung nach Anspruch 15, wobei der nicht-pathogene Mikroorganismus ein aerobes oder anaero-bes gramnegatives Bakterium der Darmflora ist.

17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei das gramne-gative Bakterium zu der Gattung *Escherichia*, *Pseu-domonas*, *Bacteroides* oder *Proteus* gehört.

18. Verwendung nach einem der Ansprüche 17, wobei das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* (Nissle 1917) ist.

20 19. Verwendung nach Anspruch 15, wobei der nicht-pathogene Mikroorganismus ein aerobes oder anaero-bes grampositives Bakterium der Darmflora ist.

20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei das grampo-sitive Bakterium zu der Gattung *Bifidobacterium*, 25 *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* ge-hört.

21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei das grampositivie Bakterium *Streptococcus gordonii* ist.
22. Verwendung nach Anspruch 11, wobei der nicht-pathogene Mikroorganismus ein Mikroorganismus ist,
5 der nicht zu den Kommensalen von Mensch oder Tier gehört.
23. Verwendung nach Anspruch 22, wobei der nicht-pathogene Mikroorganismus ein Bakterium ist, das zur fermentativen Herstellung von Lebensmitteln
10 verwendet wird.
24. Verwendung nach Anspruch 22 oder 23, wobei es sich bei dem Bakterium um Milchsäurebakterien wie *Lactococcus lactis*, *Lactococcus delbrueckii* subspec. *bulgaricus*, *Lactobacillus caucasicus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*, *Streptococcus thermophilus* oder *Leuconostoc* handelt.
15
25. Verwendung nach einem der Ansprüche 11 bis 24, wobei es sich bei dem Mikroorganismus um eine „leaky“-Mutante handelt.
- 20 26. Verwendung nach Anspruch 11 bis 25, wobei die in dem Mikroorganismus enthaltene, SLPI oder ein Fragment oder Derivat davon codierende Nucleinsäure in einem Vektor insertiert ist.
- 25 27. Verwendung nach Anspruch 26, wobei der Vektor ein Plasmid, Cosmid, Bakteriophage oder Virus ist.
28. Verwendung nach Anspruch 26 oder 27, wobei die in einem Vektor insertierte Nucleinsäure unter der funktionellen Kontrolle von mindestens einem requ-

latorischen Element steht, das die Transkription der Nucleinsäure in eine translatierbare RNA und/oder die Translation der RNA in ein Protein vor, während oder nach der Verabreichung gewährleistet.

29. Verwendung nach Anspruch 28, wobei das mindestens ein regulatorische Element ein Promotor, eine Ribosomenbindungsstelle, eine Signalsequenz oder ein 3'-Transkriptionsterminator ist.

10 30. Verwendung nach Anspruch 29, wobei der Promotor ein induzierbarer Promotor ist.

31. Verwendung nach Anspruch 30, wobei der Promotor ein Promotor ist, der durch Nährstoffmangel induzierbar ist.

15 32. Verwendung nach Anspruch 30 oder 31, wobei der Promotor ein trp-, lac- oder tac-Promotor von Escherichia coli ist.

20 33. Verwendung nach Anspruch 30 oder 31, wobei der Promotor der phoA-Promotor von Escherichia coli ist.

34. Verwendung nach Anspruch 30 oder 31, wobei der Promotor der Promotor des PHO 5-Gens von Hefe ist.

35. Verwendung nach Anspruch 30 oder 31, wobei der Promotor der Promotor des ADH 1-Gens von Hefe ist.

25 36. Verwendung nach einem der Ansprüche 29 bis 35, wobei die Ribosomenbindungsstelle eine Shine-Dalgarno-Sequenz ist.

37. Verwendung nach einem der Ansprüche 29 bis 36, wobei die Signalsequenz eine bakterielle oder pilzliche Signalsequenz ist, die die Sekretion des Proteins aus dem Cytoplasma des Mikroorganismus in den 5 periplasmatischen Raum oder in die Umgebung des Mikroorganismus bewirkt.

38. Verwendung nach Anspruch 37, wobei es sich bei der bakteriellen Signalsequenz um die Signalsequenz des β -Lactamase-Gens von Escherichia coli oder die 10 Signalsequenz des ompA-Gens von Escherichia coli handelt.

39. Verwendung nach Anspruch 37, wobei es sich bei der pilzlichen Signalsequenz um die Signalsequenz des α -Faktors von Hefe oder die Signalsequenz des 15 Killertoxins von Hefe handelt.

40. Verwendung nach einem der Ansprüche 11 bis 39, wobei der zur SLPI-Bildung befähigte nicht-pathogene Mikroorganismus in einer pharmazeutischen Zusammensetzung enthalten ist.

20 41. Verwendung nach Anspruch 40, wobei die den Mikroorganismus enthaltende pharmazeutische Zusammensetzung oral verabreicht wird.

42. Verwendung nach Anspruch 41, wobei die den Mikroorganismus enthaltende pharmazeutische Zusammensetzung 25 in Form einer Suspension, Tablette, Pille, Kapsel, eines Granulats oder Pulvers verabreicht wird.

43. Verwendung nach Anspruch 40, wobei die den Mikroorganismus enthaltende pharmazeutische Zusammensetzung rektal verabreicht wird.

44. Verwendung nach Anspruch 43, wobei die den Mikroorganismus enthaltende pharmazeutische Zusammensetzung in Form eines Suppositoriums, Klysmas oder Schaums verabreicht wird.

45. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend mindestens eine Zelle eines zur SLPI-Bildung befähigten nicht-pathogenen Mikroorganismus, der eine exprimierbare, SLPI oder ein Fragment oder Derivat davon codierende Nucleinsäure enthält.

46. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 45, wobei der Mikroorganismus ein anaerobes oder aerobes, gramnegatives oder grampositives Bakterium der Darmflora ist.

47. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 45, wobei der Mikroorganismus eine Kommensalhefe von Mensch oder Tier ist.

48. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 45, wobei der Mikroorganismus ein Bakterium ist, das zur fermentativen Herstellung von Lebensmitteln verwendet werden kann.

49. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 45, wobei der Mikroorganismus eine „Leaky“-Mutante ist.

50. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 45 bis 49, wobei die SLPI oder ein Frag-

ment oder Derivat davon codierende Nucleinsäure in einem Expressionsvektor insertiert ist und wobei die Expression der Nucleinsäure unter der Kontrolle von mindestens einem regulatorischen Element steht,
5 so dass der Wirkstoff vor, während oder nach der Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung an einen Menschen oder ein Tier exprimiert und nach der Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung an die Organe des Verdauungstraktes abgegeben
10 wird.

51. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, umfassend:

- a) Isolierung oder Synthese einer den Wirkstoff SPLI codierenden Nucleinsäuresequenz;
- 15 b) Clonierung der SPLI codierenden Nucleinsäuresequenz in einen bakteriellen oder pilzlichen Expressionsvektor;
- c) Transformation des bei b) erhaltenen rekombinanten Expressionsvektor in eine mikrobielle Wirtszelle, die ein Kommensale von Mensch oder Tier oder ein natürlicher Bestandteil der Darmflora von Mensch oder Tier ist und/oder zur fermentativen Herstellung von Lebensmitteln verwendet werden
20 kann;
- 25 d) Vermehrung der transformierten Wirtszelle;
- e) Herstellung eines Immobilisats, Lyophilisats oder Suspension transformierter Wirtszellen; und

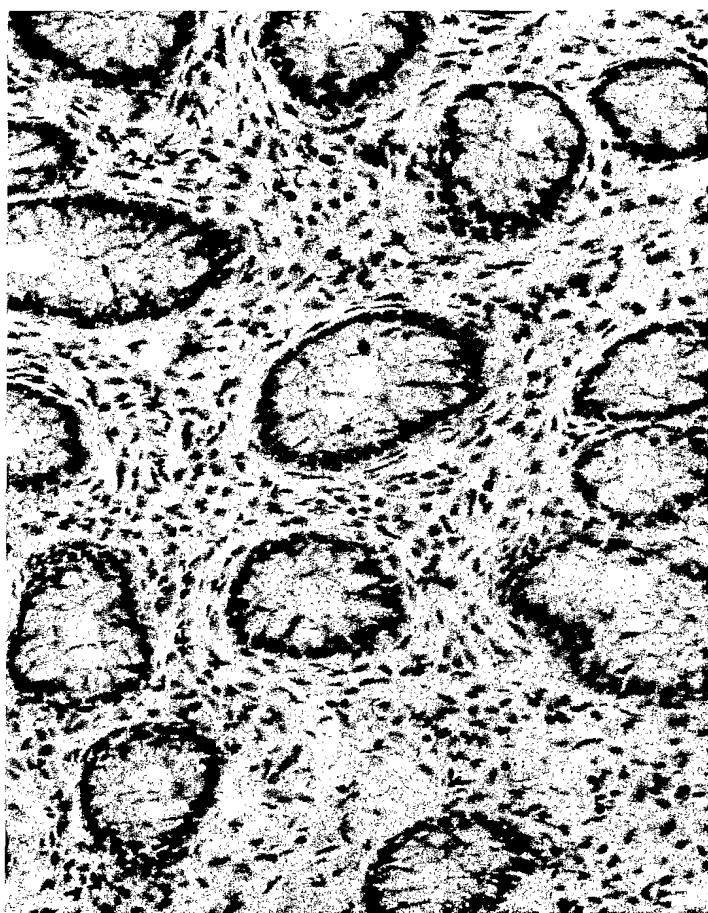
- 63 -

- f) Mischen des/der bei e) erhaltenen Immobilisats, Lyophilisats oder Suspension transformierter Wirtszellen mit physiologisch verträglichen Excipienten, Stabilisatoren, Verdickungsmitteln, Trennmitteln, 5 Gleitmitteln, Emulgatoren oder ähnlichen Stoffen zum Erhalt der pharmazeutischen Zusammensetzung.

10



Figur 1



Figur 2